

**EINFLUSS VON
GONADOTROPIN-RELEASING HORMON AUF DIE
GONADOTROPIN- UND TESTOSTERONSEKRETION
BEI NORMALPERSONEN
UND HYPOGONADEN PATIENTEN**

Gottfried J. Köppl

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

(DIREKTOR: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN)

EINFLUSS VON GONADOTROPIN-RELEASING HORMON
AUF DIE GONADOTROPIN- UND TESTOSTERONSEKRETION BEI NORMAL-
PERSONEN UND HYPOGONADEN PATIENTEN

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

GOTTFRIED J. KÖPPL

AUS

MÜNCHEN

1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doiz.Dr.K.von Werder
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.E.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1976



1919

Der Verfasser hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Geschichte der
deutschen Literatur des 19. Jahrhunderts zu schreiben. Diese Aufgabe
war ihm sehr schwer, da er nicht nur die Geschichte der Literatur,
sondern auch die Geschichte der Wissenschaften und der Kunst des
19. Jahrhunderts zu schreiben hatte. Er hat sich aber nicht
erschrecken lassen und hat die Aufgabe mit großer Sorgfalt
erfüllt. Er hat die Geschichte der deutschen Literatur des
19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt, wie sie noch
niemand zuvor getan hat. Er hat die Geschichte der deutschen
Literatur des 19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt,
wie sie noch niemand zuvor getan hat.

MEINEN ELTERN

Der Verfasser hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Geschichte der
deutschen Literatur des 19. Jahrhunderts zu schreiben. Diese Aufgabe
war ihm sehr schwer, da er nicht nur die Geschichte der Literatur,
sondern auch die Geschichte der Wissenschaften und der Kunst des
19. Jahrhunderts zu schreiben hatte. Er hat sich aber nicht
erschrecken lassen und hat die Aufgabe mit großer Sorgfalt
erfüllt. Er hat die Geschichte der deutschen Literatur des
19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt, wie sie noch
niemand zuvor getan hat. Er hat die Geschichte der deutschen
Literatur des 19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt,
wie sie noch niemand zuvor getan hat.

Der Verfasser hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Geschichte der
deutschen Literatur des 19. Jahrhunderts zu schreiben. Diese Aufgabe
war ihm sehr schwer, da er nicht nur die Geschichte der Literatur,
sondern auch die Geschichte der Wissenschaften und der Kunst des
19. Jahrhunderts zu schreiben hatte. Er hat sich aber nicht
erschrecken lassen und hat die Aufgabe mit großer Sorgfalt
erfüllt. Er hat die Geschichte der deutschen Literatur des
19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt, wie sie noch
niemand zuvor getan hat. Er hat die Geschichte der deutschen
Literatur des 19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt,
wie sie noch niemand zuvor getan hat.

Der Verfasser hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Geschichte der
deutschen Literatur des 19. Jahrhunderts zu schreiben. Diese Aufgabe
war ihm sehr schwer, da er nicht nur die Geschichte der Literatur,
sondern auch die Geschichte der Wissenschaften und der Kunst des
19. Jahrhunderts zu schreiben hatte. Er hat sich aber nicht
erschrecken lassen und hat die Aufgabe mit großer Sorgfalt
erfüllt. Er hat die Geschichte der deutschen Literatur des
19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt, wie sie noch
niemand zuvor getan hat. Er hat die Geschichte der deutschen
Literatur des 19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt,
wie sie noch niemand zuvor getan hat.

Der Verfasser hat es sich zur Aufgabe gemacht, die Geschichte der
deutschen Literatur des 19. Jahrhunderts zu schreiben. Diese Aufgabe
war ihm sehr schwer, da er nicht nur die Geschichte der Literatur,
sondern auch die Geschichte der Wissenschaften und der Kunst des
19. Jahrhunderts zu schreiben hatte. Er hat sich aber nicht
erschrecken lassen und hat die Aufgabe mit großer Sorgfalt
erfüllt. Er hat die Geschichte der deutschen Literatur des
19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt, wie sie noch
niemand zuvor getan hat. Er hat die Geschichte der deutschen
Literatur des 19. Jahrhunderts in einer Weise dargestellt,
wie sie noch niemand zuvor getan hat.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand auf die Anregung von Herrn Privatdozent Dr.med. A. Souvatzoglou. Nach seinem Weggang aus München übernahm Herr Privatdozent Dr.med. K. von Werder die weitere Betreuung; ihm verdanke ich wertvolle Hinweise zur Planung und Durchführung der experimentellen Untersuchungen sowie zur Darstellung der Ergebnisse.

Herrn Professor Dr.med. P.C. Scriba danke ich für das wohlwollende Interesse an meiner Arbeit.

Herr Dr.med. Dipl.-Biochem. F. Bidlingmaier von der Kinderklinik der Universität München stellte mir freundlicherweise Antiserum für die radioimmunologische Testosteronbestimmung zur Verfügung.

Fräulein B. Glöckner, Fräulein R. Rothenfußer und Fräulein B. Schultz danke ich für die sorgfältige Ausführung der Hypophysenhormon-Bestimmungen.

Diese Dissertation wurde mit Mitteln des Sonderforschungsbereichs 51 der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Abkürzungsverzeichnis

CPBA	= Kompetitiver Proteinbindungstest
DHEA	= Dehydroepiandrosteron
DHT	= 5-Dihydrotestosteron
FSH (hFSH)	= (humanes) Follikel-stimulierendes Hormon
GH (hGH)	= (humanes) Wachstumshormon
GnRH	= Gonadotropin-Releasing Hormon
hCG	= humanes Choriongonadotropin
LH (hLH)	= (humanes) Luteinisierungshormon
LHRH = GnRH	= Luteinisierungshormon-Releasing Hormon
PRL (hPRL)	= (humanes) Prolaktin
RIA	= Radioimmunoassay
SHBG	= Sexualhormon-bindendes Globulin
TSH (hTSH)	= (humanes) Thyreoidea-stimulierendes Hormon

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
1.1. Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Gonaden-Achse	1
1.2. Thema der Arbeit	2
<u>2. METHODIK</u>	4
2.1. Testosteronbestimmung	4
2.1.1. Vorversuche zur radioimmunologischen Testosteronbestimmung	4
2.1.1.1. Extraktion von Testosteron aus dem Serum	4
2.1.1.2. Problem des Lösungsmittel-Leerwerts	6
2.1.1.3. Testosteron-Antiseren	6
2.1.1.4. Standardkurven	10
2.1.1.5. Trennung von freiem und antikörpergebundenem Hormon	13
2.1.2. Routinemäßige Durchführung der Testosteronbestimmung	15
2.1.2.1. Reagentien	15
2.1.2.1.1. Pufferlösungen	15
2.1.2.1.2. Organische Lösungsmittel	15
2.1.2.1.3. Testosteron-Standardlösungen	15
2.1.2.1.4. Tracer-Lösungen	16
2.1.2.1.5. Antiserum-Verdünnung	16
2.1.2.1.6. Dextran-Aktivkohle-Suspension	16
2.1.2.1.7. Szintillationsflüssigkeit	17
2.1.2.2. Ansatz	17
2.1.2.2.1. Vorbereitung der Glaswaren	17

	Seite
2.1.2.2.2. Herstellung der Serumverdünnungen	17
2.1.2.2.3. Extraktion	18
2.1.2.2.4. Vorinkubation; Bestimmung der Wiederfindung	19
2.1.2.2.5. Tracerinkubation	19
2.1.2.2.6. Trennung von freiem und gebundenem Testosteron	19
2.1.2.2.7. Messung des ^3H -Testosterons	20
2.1.2.3. Auswertung	20
2.1.2.4. Qualitätskontrolle	24
2.2. Radioimmunologische LH-Bestimmung	25
2.3. Radioimmunologische FSH-Bestimmung	25
2.4. Radioimmunologische GH-Bestimmung	25
2.5. Radioimmunologische PRL-Bestimmung	26
2.6. Radioimmunologische TSH-Bestimmung	27
2.7. Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH)	27
2.7.1. Intravenöse Verabreichung von GnRH	27
2.7.2. Intranasale Verabreichung von GnRH	27
<u>3. PATIENTEN</u>	29
3.1. Normalpersonen	29
3.2. Hypogonade Patienten	29
3.2.1. Patienten mit primärem Hypogonadismus	29
3.2.2. Patienten mit sekundärem Hypogonadismus	30
<u>4. ERGEBNISSE</u>	32
4.1. Normalbereich der Testosteronspiegel	32

4.2.	25 und 100 ug GnRH i.v. bei Normalpersonen	32
4.2.1.	Serum-LH-Spiegel	32
4.2.2.	Serum-FSH-Spiegel	33
4.2.3.	Serum-Testosteronspiegel	41
4.2.4.	Serumspiegel von GH, PRL und TSH	42
4.3.	Intranasale Applikation von GnRH bei Normalpersonen	43
4.4.	GnRH bei hypogonaden Patienten	45
4.4.1.	GnRH bei Patienten mit primärem Hypogonadismus	45
4.4.1.1.	Serum-LH und -FSH vor und nach GnRH-Stimulation	45
4.4.1.2.	Serum-Testosteronspiegel	49
4.4.2.	GnRH bei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus	49
4.4.2.1.	Serum-LH und -FSH vor und nach GnRH-Stimulation	49
4.4.2.2.	Serum-Testosteronspiegel	51
5.	<u>DISKUSSION</u>	55
5.1.	Testosteronbestimmung	55
5.2.	Stimulation der LH- und FSH- Sekretion durch GnRH bei Normal- personen; Spezifität	57
5.3.	Serum-Testosteronspiegel nach 25 und 100 ug GnRH i.v.	58
5.4.	Der GnRH-Test in der Diagnostik des primären Hypogonadismus	60
5.5.	Der GnRH-Test in der Diagnostik des sekundären Hypogonadismus	61
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	64
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	68

1. EINLEITUNG

1.1. Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Gonaden-Achse

Die Entwicklung äußerst empfindlicher und spezifischer Hormonbestimmungsmethoden, besonders des 1960 zum erstenmal von YALOW und BERSON für das Insulin angewendeten Radioimmunoassays (107), sowie das Prinzip, mit Hilfe von Stimulations- und Suppressionstesten den Funktionszustand einer endokrinen Drüse zu erfassen, haben in den letzten Jahren zu einem genaueren Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge von endokrinen Funktionen geführt.

Für die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse des Mannes steht dabei die differentialdiagnostische Abgrenzung verschiedener Formen des Hypogonadismus (95) im Vordergrund des klinischen Interesses, zum Beispiel die Erfassung eines sekundären Hypogonadismus im Verlaufe der Entwicklung eines Hypophysentumors, der hier oft ein Frühsymptom darstellt (90). Dazu ist die Dokumentation von Unterfunktionszuständen sehr wichtig (30, 103).

Nach dem klassischen Konzept von GREEP und FEVOLD (35) ist der physiologische Stimulus für die Ausschüttung von Testosteron aus den Leydig'schen Interstitialzellen des Hodens das LH des Hypophysenvorderlappens, während das FSH ausschließlich die Proliferation des Germinalepithels der Hodentubuli stimulieren soll. Versuche, die Testosteronsekretion mit humanem LH zu stimulieren, sind wegen der Schwierigkeit, reine Hormonpräparationen herzustellen, aufwendig und von zweifelhaftem Erfolg (61, 80). Dagegen führt die Zufuhr hoher Dosen des zum hLH homologen hCG bei gesunden Männern regelmäßig zu einer Stimulation der Testosteronsekretion (6, 18, 51). Hierauf läßt sich ein Funktionstest für die Leydig-Zellen aufbauen (73).

Die experimentelle Forschung der letzten Jahre hat bestätigt, daß die Hypophysenvorderlappenfunktion unter der Kontrolle des Hypothalamus steht (92). Hieraus ergaben sich Möglichkeiten, durch Stimulation der endogenen LH-Sekretion die Testosteronsekretion zu steigern. So führt mehrtägige orale Verabreichung des Antiöstrogens Clomiphen wahrscheinlich über einen hypothalamischen Angriffspunkt zu Mehrsekretion von LH, FSH und Testosteron (7).

Der Arbeitsgruppe um SCHALLY gelang 1971 die Isolierung und Identifizierung eines hypothalamischen Releasing-Hormons (88), das in vitro und in vivo Synthese und Sekretion von LH und FSH stimuliert (89). Dieses GnRH genannte Releasing-Hormon ist ein Dekapeptid vom Molekulargewicht 1181 (5) (Abb. 1). Die Bereitstellung von synthetischem GnRH ermöglichte die Einführung eines Stimulationstestes, mit dem sich auf einfache Weise die Gonadotropinreserve des Hypophysenvorderlappens beurteilen läßt. Welchen Einfluß die durch GnRH hervorgerufene LH-Mehrsekretion auf die Produktion und Sekretion von Testosteron ausübt, ist bisher noch wenig untersucht (58, 62, 95, 102). Falls ein Einfluß nachgewiesen werden könnte, wäre ein kombinierter Test für die Gonadotropinfunktion des Hypophysenvorderlappens und die inkretorische Hodenfunktion mit Hilfe von synthetischem GnRH möglich.

1.2. Thema der Arbeit

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, die Wirkung verschiedener GnRH-Dosen auf den Serumspiegel von LH, FSH und Testosteron bei männlichen Normalpersonen festzustellen. Hierzu wurde eine Testosteron-Bestimmungsmethode aufgestellt, die die gleichzeitige Bestimmung von zehn Serumproben erlaubte. Weiterhin wurde durch GH-, PRL- und TSH-Bestimmungen der Frage nach der Spezifität der GnRH-Wirkung nachgegangen. An drei Probanden wurde die Wirksamkeit von GnRH bei intra-

nasaler Applikation geprüft. Schließlich wurde an Patienten, die an einem Hypogonadismus verschiedener Ätiologie litten, die diagnostische Brauchbarkeit von GnRH-Testen mit LH-, FSH- und Testosteronbestimmung bei verschiedenen Formen des männlichen Hypogonadismus untersucht.

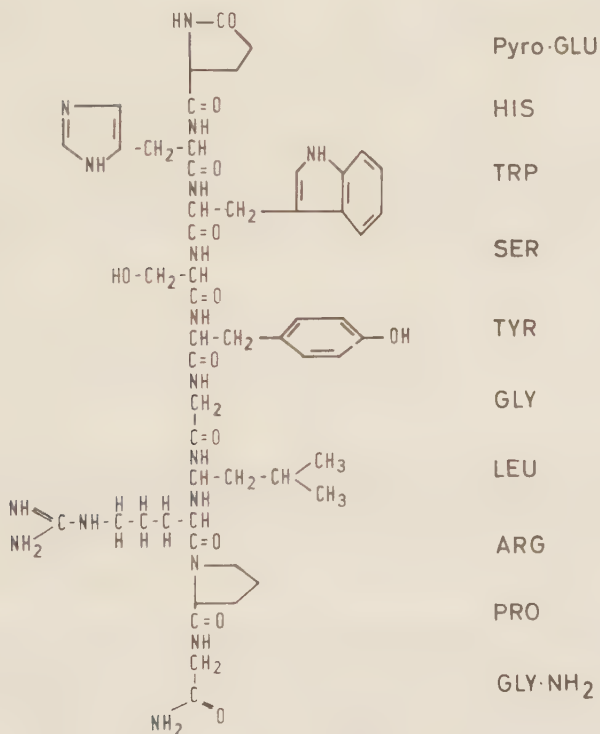


Abb. 1: Strukturformel von GnRH.

2. METHODIK

2.1. Testosteronbestimmung

2.1.1. Vorversuche zur radioimmunologischen Testosteronbestimmung

2.1.1.1. Extraktion von Testosteron aus dem Serum

Ein Teil des im peripheren Blut zirkulierenden Testosterons ist an ein in der Leber gebildetes Transportglobulin, das SHBG gebunden (19). Beim gesunden Mann sind etwa 65 % des Gesamttestosterons an SHBG gebunden, beim orchiectomierten Mann und bei der Frau ist dieser Anteil noch bedeutend höher (106). Das SHBG hat hohe Assoziationskonstanten und eine spezifische Affinität zu den Steroiden mit einer β -Hydroxylgruppe (Testosteron, DHT, 17 β -Östradiol) (67). Dadurch ist eine Bestimmung des Gesamttestosterons im Serum mit auf kompetitiver Proteinbindung beruhenden Methoden, wie CPBA und RIA, ohne vorherige Extraktion des Testosterons aus dem Serum praktisch unmöglich.

Für die Extraktion von Steroiden aus Plasma oder Serum werden verschiedene organische Lösungsmittel verwendet. Während für Progesteron und 11-Desoxycorticoide in niedrigsiedendem Petroläther bzw. Tetrachlorkohlenstoff relativ selektive Extraktionsmittel zur Verfügung stehen, ist kein Lösungsmittel bekannt, das eine selektive Extraktion von Testosteron aus dem Serum ermöglichen würde (13). Dichlormethan und Diäthyläther werden zur Extraktion von Steroidhormonen häufig verwendet, extrahieren jedoch gleichzeitig eine Reihe anderer apolarer Substanzen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Wiederfindung des extrahierten Steroids im Extrakt. 0.1 ml Serum wurden etwa 1500 cpm ^3H -Testosteron zugesetzt, eine Stunde bei 37° C äquilibriert, 20 Minuten lang mit je 5 ml verschiedener Extraktionsmittel geschüttelt und die im Extrakt wiedergefundene Aktivität als Prozent der eingesetzten Aktivität ermittelt (Abb. 2). Nach den Ergebnissen des Versuchs ist Diäthyläther für die Extraktion aus dem Serum weitaus am

besten geeignet. Eine statistisch gesicherte Überlegenheit des peroxidfreien Äthers pro narcosi gegenüber dem analysenreinen Äther kann nicht festgestellt werden (Abb. 2).

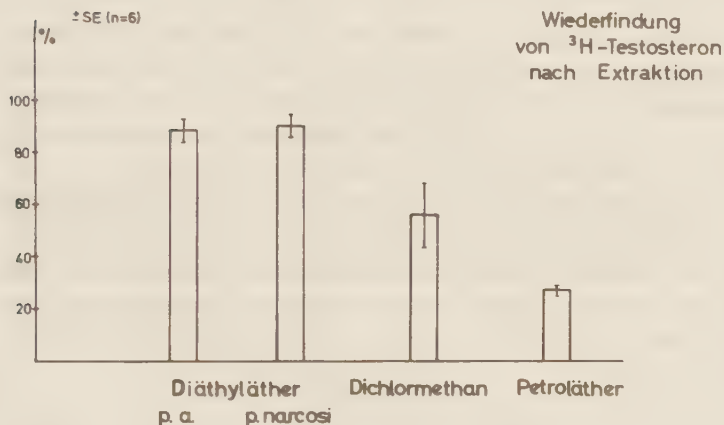


Abb. 2: Extraktion von Testosteron mit verschiedenen Lösungsmitteln. Aufgetragen ist der im Extrakt wiedergefundene Anteil des zum Serum zugesetzten radioaktiv markierten Testosterons.

Die Wiederfindung von markiertem Testosteron im Ätherextrakt beträgt $89.3 \pm 5.7 \%$ und ist für die Extraktion aus unverdünnten Seren und Serumverdünnungen in Pufferlösungen praktisch gleich. Die Abtrennung der Ätherphase von der Serumphase kann auf verschiedene Weise erfolgen, ohne daß die Wiederfindung beeinflußt wird.

2.1.1.2. Problem des Lösungsmittel-Leerwerts

Bei Steroidhormonbestimmungen mit dem CPBA, der eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln erfordert, macht man die Erfahrung, daß Meßwerte, die in Anwesenheit des Extraktionsmittels erstellt werden, zu hoch ausfallen. Man erklärt diese Tatsache dadurch, daß die Extraktionsmittel, besonders Diäthyläther, Faktoren enthalten, die mit der Methode interferieren und wie "Testosteronäquivalente" gemessen werden (78).

Eine Kontrolle dieses Effektes erfolgt durch die Bestimmung des Lösungsmittel-Leerwerts ("solvent blank") für jede neue Äthercharge. 0.1 ml Phosphatpuffer wurden mit 5 ml Diäthyläther extrahiert, die Ätherphase abgetrennt und eingeeengt. In diesen Proben wurde die O-Bindung des Antiserums (siehe 2.1.2.3.) unter den im RIA üblichen Bedingungen bestimmt. Die so erhaltene prozentuale Tracerbindung, als SB_0 bezeichnet, wurde mit dem Wert B_0 verglichen, den man ohne Durchführung einer Extraktion erhielt. Der SB_0 -Wert war regelmäßig niedriger als der B_0 -Wert und zwar betrug in unseren Versuchen

$$B_0 : 31.5 \pm 2.3 \% (\bar{x} \pm s) \text{ und}$$

$$SB_0 : 28.3 \pm 3.5 \% (\bar{x} \pm s).$$

In unserer Testosteron-Bestimmungsmethode berücksichtigten wir den Lösungsmittel-Leerwert insofern, als wir zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze den Mittelwert und die Variabilität aus fünf SB_0 -Messungen heranzogen: Der Mittelwert wurde als O-Bindung des Antiserums definiert, Werte, die im Bereich der dreifachen Standardabweichung der fünf Messungen nach unten lagen, wurden als unterhalb der Nachweisgrenze liegend betrachtet.

2.1.1.3. Testosteron-Antiseren

Steroidmoleküle an sich sind nicht immunogen, können aber als Haptene fungieren. Durch Injektion von Steroid-Protein-Konjugaten können Antikörper gegen das Hapten erzeugt werden (33). Durch die nahe chemische Verwandtschaft der Steroidmoleküle sind die so erzeugten Antiseren in der Regel nicht spezifisch (76).

Zwei verschiedene Testosteron-Antiseren wurden geprüft, die im folgenden als S.O.R.I.N. bzw. AT 80 bezeichnet werden. Beide wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim-Protein-Konjugat gewonnen, wobei als Proteinanteil im Falle des S.O.R.I.N.-Antikörpers (Isotopen-Dienst West, Frankfurt a.M.) Kaninchen-Serumalbumin, beim AT 80 (Dr.F. Bidlingmaier, Kinderklinik der Universität München) Rinderserumalbumin verwendet wurde.

In Kreuzreaktionsversuchen wurde festgestellt, in welchem Ausmaß andere Steroide die Bindung des ^3H -Testosteron-Tracers an die Antikörper zu hemmen vermögen. Der Quotient

$$\frac{\text{pg Testosteron, die 50\%-Hemmung der Tracerbindung bewirken}}{\text{pg Steroid, die 50\%-Hemmung der Tracerbindung bewirken}}$$

stellt das Ausmaß der Kreuzreaktion des betreffenden Steroids mit dem Testosteron im Testosteron-RIA dar.

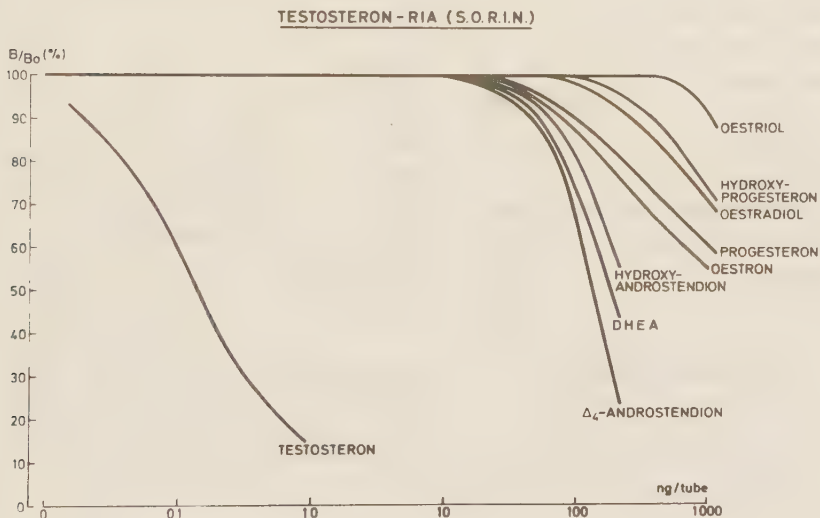


Abb. 3: Kreuzreaktionsversuche mit einigen Steroidhormonen im Testosteron-RIA unter Verwendung des S.O.R.I.N.-Antiserums.

Für das S.O.R.I.N.-Antiserum wurden die Kreuzreaktionen einiger Steroidhormone geprüft (Abb.3). In Tab. 1 sind die Kreuzreaktionen beider Testosteron-Antiseren (ausgedrückt in Prozent der Reaktion des Testosterons) zusammengefaßt.

Tab. 1: Kreuzreaktionen einiger Steroidhormone mit zwei Testosteron-Antiseren

Steroidhormon	AT 80 ¹⁾	S.O.R.I.N.
5-Dihydrotestosteron	72 %	- 2)
Androstandiol	11 %	-
Androstendion	8 %	0.14 %
11 β -Hydroxyandrostendion	-	0.07 %
Androstendiol	8 %	-
Dehydroepiandrosteron	0.1 %	0.09 %
Progesteron	0.1 %	unter 0.05 %
Desoxycorticosteron	0.07%	-
Epitestosteron	0.04%	-
Androsteron	0.04%	-
Oestradiol	unter 0.04%	unter 0.05 %
Oestron	unter 0.04%	unter 0.05 %
Oestriol	unter 0.04%	unter 0.05 %
17-Hydroxyprogesteron	unter 0.04%	unter 0.05 %
Aetiocholanolon	unter 0.04%	-
Cortisol	unter 0.04%	-

1) Werte mitgeteilt von Dr. F. Bidlingmaier, Kinderklinik der Universität München

2) - = nicht geprüft

Verständlicherweise zeigt das nur durch ein Wasserstoffatom vom Testosteron verschiedene DHT die stärkste Kreuzreaktion. Am nächsten folgen die Androgene der Nebennierenrinde. Kreuzreaktionen mit anderen Steroidhormonen spielen praktisch keine Rolle. Die Kreuzreaktionen mit dem S.O.R.I.N.-Antiserum sind in den Fällen, wo beide Antiseren getestet wurden, niedriger als die mit dem AT 80.

Die Affinität des Antiserums zum Antigen, seine Bindungskapazität, ist von den Inkubationsbedingungen abhängig. Da Antikörper-Steroidkomplexe bei 0 bis 4° C die höchsten Assoziationskonstanten erreichen sollen (13), wurde bei Kühlraumtemperaturen (4° C) gearbeitet. Steigende Verdünnungen des Antiserums (AT/80) wurden mit einer konstanten Menge von ^3H -Testosteron inkubiert. Die vom Antiserum gebundene Tracermenge, in Prozent der gesamten eingesetzten Tracermenge, nimmt mit steigender Verdünnung der Antikörper ab, bei Verlängerung der Inkubationszeit zu (Abb. 4).

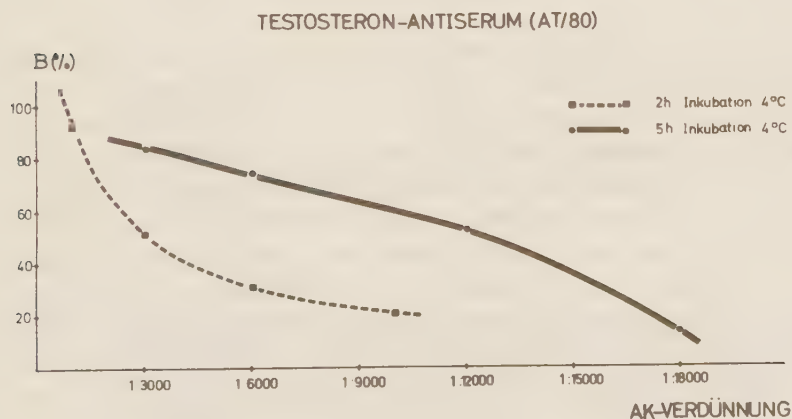


Abb. 4: Bindung von ^3H -Testosteron an Testosteron-Antiserum in Abhängigkeit von der Antikörper-Verdünnung und der Inkubationszeit (gestrichelte und ausgezogene Kurve).

Im RIA führten wir zur Steigerung der Empfindlichkeit eine lange Vorinkubation des Antiserums mit dem nicht-markierten Testosteron ("kalte Vorinkubation") durch. Hierbei sank die Bindekapazität, vielleicht durch Zerstörung eines Teils der Antikörper, ab. Im RIA konnten wir das Antiserum bei fünfstündiger Dauer der Tracerinkubation 1:7500 verdünnen, um eine etwa 30%ige Tracerbindung zu erreichen.

2.1.1.4. Standardkurven

Die Eichkurve wurde mit in absolutem Äthanol verdünnten Testosteron-Standards erstellt. Wenn diese Standards in Serum verdünnt und wie Serum behandelt werden, müssen die Meßwerte eine identische Standardkurve ergeben (Abb. 5). Dieses Vorgehen ist zugleich eine Probe auf die Wiederfindung im Extraktionsvorgang, da das Standard-Testosteron nunmehr aus Serum extrahiert werden muß (Standardkurve im Serum). Damit zusammenhängend macht sich auch der Lösungsmittel-Leerwert bemerkbar: Aus Serum extrahierte Standards werden etwas höher bestimmt als nicht-extrahierte Standards (Abb. 5).

Eine weitere grundlegende Forderung ist, daß das zu messende endogene Testosteron in gleicher Weise wie die Standardpräparation mit den Antikörpern reagiert. Der Testosteron-gehalt eines Serums wurde durch schrittweises Verdünnen in Puffer herabgesetzt und im RIA gemessen. Die Meßwerte müssen die durch die Verdünnungsschritte vorgegebenen Proportionen aufweisen. Trägt man die erhaltenen Werte auf einer Kurve auf (auf der Abszisse kann das Verdünnungsverhältnis aufgetragen werden), muß sich eine Parallelität zur Eichkurve ergeben (Abb. 6).

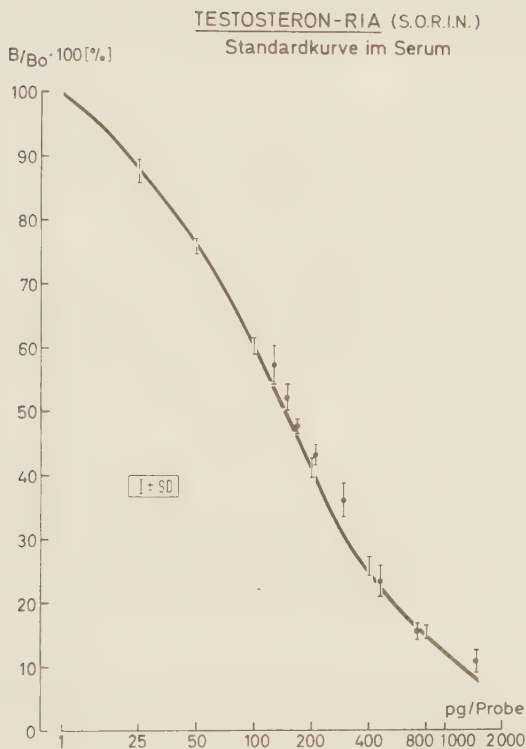


Abb. 5: Eichkurve und Standardkurve im Serum: Die ausgezogene Kurve (Eichkurve) wurde mit äthanolverdünnten, nicht-extrahierten Testosteronstandards, die eingezeichneten Punkte mit serumverdünnten und extrahierten Testosteronstandards erstellt.

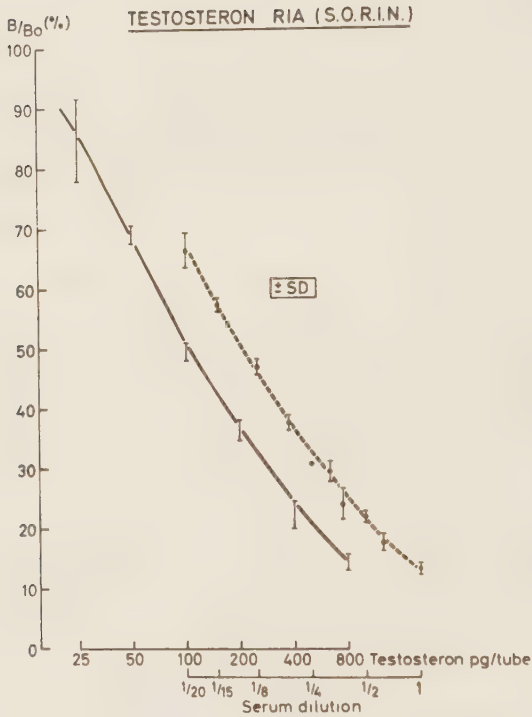


Abb. 6: Eichkurve (ausgezogen) und Serumverdünnungskurve (gestrichelt).

Die Forderung nach Parallelität mit der Eichkurve ist in wiederholten Versuchen am besten im Bereich hoher Verdünnungen erfüllt. Wir waren daher bestrebt, durch Steigerung der Empfindlichkeit der Methode die zur Bestimmung erforderliche Serummenge zu verkleinern. Wegen des unterschiedlichen Testosterongehalts ist dies bei der Bestimmung von Männerseren leichter zu verwirklichen als bei der Bestimmung von Frauenseren.

2.1.1.5. Trennung von freiem und antikörpergebundenem Hormon

Aktivkohle vermag durch Adsorption kleiner Moleküle diese von Proteinen zu trennen (66). Ob durch Beschichtung der Aktivkohle mit Dextran ein zusätzlicher Molekularsiebeffekt zustandekommt, ist umstritten (8, 34). Der Zusatz inerter Proteine soll die Adsorption beladener Proteine möglichst gering halten (13).

In unserem Testosteron-RIA verwenden wir eine Suspension von 0.05 % Dextran T 70 und 0.5 % Aktivkohle (Norit A) in 0.05 M Phosphat-Puffer mit Zusatz von 0.5 % reinem Rinderalbumin. Bei einer Temperatur von 0° C inkubieren wir die Proben 10 bis 14 Minuten lang mit 0.5 ml dieser Suspension und zentrifugieren 10 Minuten lang bei 4000 rpm. Hierdurch wird eine ausgezeichnete Trennung der beladenen Proteine, die im Überstand bleiben, von den adsorbierten und abzentrifugierten freien Molekülen erzielt.

Die Methode, deren Vorteil in ihrer schnellen Durchführbarkeit liegt, erfordert weitgehende Temperatur- und Zeitkonstanz in der Behandlung der einzelnen Proben. Die Temperatur wird durch Verwendung eines Eiswasserbades konstant gehalten. Durch den Pipettiervorgang entsteht jedoch eine Zeitdifferenz bei der Inkubation der zuerst und zuletzt pipettierten Proben, die durch unterschiedlich starke Adsorption Einfluß auf die Trennung haben könnte (Abb. 7). Es hat sich jedoch gezeigt, daß eine Zeitdifferenz von vier Minuten, wie wir sie in unserer Bestimmungsmethode als tolerabel ansehen, keinen Einfluß auf die Trennung der freien und gebundenen ³H-Testosteronmoleküle hat.

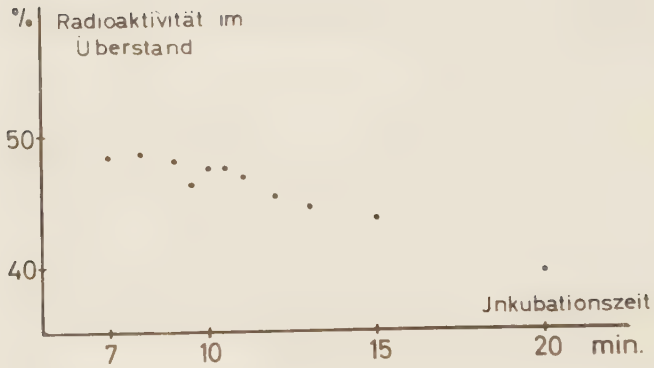


Abb. 7: Bei Verlängerung der Inkubationszeit mit Dextran-Aktivkohle-Suspension nimmt die nach Abzentrifugieren der Suspension im Überstand verbleibende Menge an ^3H -Testosteron infolge stärkerer Adsorption an Aktivkohle ab.

2.1.2. Routinemäßige Durchführung
der Testosteronbestimmung

2.1.2.1. Reagentien

2.1.2.1.1. Pufferlösungen

0.05 M Sörensen-Phosphatpuffer:

KH_2PO_4 6.81 g in 100 ml aqua bidest. lösen,
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44.5 g in 500 ml aqua bidest. lösen,
beides mischen, bis sich ein pH von 7.5 einstellt.
Hieraus werden mit aqua bidest. 1:10 verdünnte
Lösungen hergestellt.

Phosphat-Albumin-Puffer:

0.5 g reinstes Rinderalbumin (Behring) werden in 100 ml
0.05 M Sörensen-Phosphatpuffer aufgelöst. Diese Puffer-
lösung wird vor jedem Ansatz frisch zubereitet.

2.1.2.1.2. Organische Lösungsmittel

Methanol für Waschw Zwecke

Äthanol pro analysi (Merck, Darmstadt)

Diäthyläther pro analysi (Merck, Darmstadt)

2.1.2.1.3. Testosteron-Standardlösungen

Die Standardpräparation (Institute of Clinical Physiology,
National Research Council, Pisa, Italy) enthält 800 ng Testo-
steron in 1.0 ml Äthanol gelöst. Durch stufenweises Verdünnen
mit Äthanol werden Standardlösungen von 2, 1, 0.5, 0.25 und
0.125 ng Testosteron pro ml hergestellt. Die Standardlösungen
werden in sorgfältig gereinigten und fest verschlossenen Glas-
behältern bei 4° C bis zu drei Monaten aufbewahrt und vor Ge-
brauch auf Zimmertemperatur gebracht.

2.1.2.1.4. Tracer-Lösungen

Die Ausgangspräparation (Institut des Radioelements CEN-SCK, Mol-Donk, Belgium) enthält 0.1 mCi Testosteron-1,2-³H in 0.3 ml Äthanol-Benzol-(1:9)-Lösung; die spezifische Aktivität beträgt 46 Ci/mMol.

Tracer-Stammlösung:

Die Ausgangspräparation (0.3 ml) wird mit 29.7 ml Äthanol verdünnt. Diese Lösung wird in einem sorgfältig gereinigten und fest verschlossenen Glasbehälter bei 4° C aufbewahrt.

Tracer A (für die Bestimmung der Wiederfindung):

Die Tracer-Stammlösung wird mit 0.05 M Sörensen-Phosphat-Puffer so verdünnt, daß 0.1 ml der Lösung etwa 250 cpm ergeben (z.B. 0.05 ml Tracer-Stammlösung zu 2.5 ml Puffer). Diese Lösung wird vor Gebrauch frisch bereitet.

Tracer B (für den Verdrängungsansatz):

Die Tracer-Stammlösung wird mit Phosphat-Albumin-Puffer so verdünnt, daß 0.1 ml der Lösung etwa 90 000 cpm ergeben (z.B. 0.5 ml Tracer-Stammlösung zu 7.0 ml Puffer). Diese Lösung wird vor Gebrauch frisch bereitet.

2.1.2.1.5. Antiserum-Verdünnung

Das Serum immunisierter Kaninchen (AT/80, Dr. F.Bidlingmaier, Kinderklinik der Universität München) wird mit Phosphat-Albumin-Puffer 1:1000 verdünnt und in 1 ml-Portionen in Eppendorf-Gefäßen eingefroren. Vor Gebrauch werden 4 ml aufgetaut und mit 30 ml Phosphat-Albumin-Puffer verdünnt.

2.1.2.1.6. Dextran-Aktivkohle-Suspension

0.5 g Norit A (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) werden unter Rühren zu 100 ml Phosphat-Albumin-Puffer gegeben. 0.05 g Dextran T 70 (Pharmacia, Uppsala) werden unter Rühren zu 100 ml Phosphat-Albumin-Puffer gegeben. Beide Suspensionen

werden gemischt. Bei 4° C kann die Suspension bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

2.1.2.1.7. Szintillationsflüssigkeit

7 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) (Fluka),
0.3 g 1,4-bis-2(5-phenyloxazolyl)-benzen (POPOP) (Tracerlab),
100 g Naphthalin (Merck)

werden in 1 l Dioxan p.a. (Merck) gelöst, drei Stunden geschüttelt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2.1.2.2. Ansatz

Die folgende Beschreibung gilt für die Bestimmung von zehn Seren als Vierfachwerte.

2.1.2.2.1. Vorbereitung der Glaswaren

Benötigt werden 15 Reagensgläser, 45 Extraktionsgläser mit Schliffstopfen, 60 konische Zentrifugengläser, 2 Bechergläser 50 ml, 1 Glaspipette 1 ml, 1 Glaspipette 2 ml, 2 Glaspipetten 10 ml. Alle Glaswaren werden vor Gebrauch mit einem Detergens und heißem Wasser gewaschen und gespült, über Nacht in Chromschwefelsäure eingelegt und mit 0.1-prozentiger Natriumsulfitlösung nachgespült, mit klarem Wasser und mehrmals mit destilliertem Wasser abgewaschen und im Trockenschrank (65° C) getrocknet. Vor Gebrauch werden sie über Nacht in Methanol eingelegt und im Trockenschrank getrocknet.

2.1.2.2.2. Herstellung der Serumverdünnungen

In einem Reagensglas wird Tracer A bereitet. In 10 Reagensgläser werden jeweils

0.9 ml 0.05 M Sörensen-Phosphatpuffer

0.1 ml Tracer A

0.1 ml Serum (von männlichen Normalpersonen) einpipettiert.

Anmerkung: Wenn Serum von hypogonaden Patienten oder von Frauen bestimmt werden soll, wird das Serum entsprechend weniger verdünnt (z.B. 0.5 ml Puffer + 0.1 ml Tracer + 0.4 ml Serum).

Der Rest der Lösung Tracer A wird für die Bestimmung der Wiederfindung aufbewahrt. Alle Reagensgläser werden 5 Sekunden lang geschüttelt (Vortex-Genie, Scientific Industries Inc.) und im Inkubator (Heraeus, Mannheim) bei 37° C mit Parafilm (American Can Comp.) bedeckt stehen gelassen.

2.1.2.2.3. Extraktion

Aus jedem Reagensglas werden jeweils 4mal 0.1 ml der Serumverdünnung in beschriftete Extraktionsgläser transferiert. Für die SB_0 -Werte werden in fünf weitere Extraktionsgläser je 0.1 ml 0.05 M Sörensen-Phosphat-Puffer einpipettiert. In alle Extraktionsgläser werden mit einer Pipette je 5 ml Diäthyläther gegeben und die Extraktionsgläser mit Schliffstopfen verschlossen. Danach werden die Gläser auf einem mechanischen Rüttler (Köttermann Typ 5627) 30 Minuten lang geschüttelt. Ein etwa faustgroßes Stück Trockeneis (Kainz KG, München) wird in ein Plastikgefäß mit etwa 50 ml Methanol gegeben. Die Extraktionsgläser werden einzeln senkrecht in die Trockeneis-Methanol-Mischung (Temperatur bis - 90° C) gehalten, bis die Serum- bzw. Pufferphase unten am Glas angefroren ist (etwa 5 Sekunden). Die überstehende Ätherphase wird in (entsprechend den Extraktionsgläsern beschriftete) konische Zentrifugengläser möglichst quantitativ abgegossen. Die Zentrifugengläser werden an die Silikonstopfen einer Metallspinne angehängt und der Inhalt im Wasserbad von 32° C (Thermostat) bei mildem Unterdruck (Anlegen einer Wasserstrahlpumpe an die Metallspinne) bis zur vollständigen Trockenheit eingengt. Aus den Testosteron-Standardlösungen werden je dreimal 0.1 ml in konische Zentrifugengläser transferiert, diese an die Silikonstopfen der Metallspinne angehängt und im Wasserbad von 40° C (Thermostat) bei mildem Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) bis zur vollständigen Trockenheit eingengt.

2.1.2.2.4. Vorinkubation - Bestimmung der Wiederfindung

In Standardproben und SB₀-Proben werden je 0.4 ml der Antiserumverdünnung, in Serumproben je 0.5 ml der Antiserumverdünnung einpipettiert und alle Gläser 5 Sekunden (Vortex) geschüttelt.

In 43 Zählgefäße (New England Nuclear) werden mit einer Zipette je 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Aus den Gläsern mit den Serumproben werden je 0.1 ml, aus der Tracer A-Lösung dreimal 0.1 ml entnommen und in die Zählgefäße transferiert. Die Zählgefäße werden verschlossen, 10 Minuten geschüttelt (Vortex), auf 4° C abgekühlt (Kühlschrank) und im Szintillationsspektrometer (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3003, Einstellung des Zählers siehe 2.1.2.2.7.) 20 Minuten pro Probe gezählt.

Die Zentrifugengläser werden mit Parafilm bedeckt und bei 4° C über Nacht inkubiert.

2.1.2.2.5. Tracerinkubation

In alle Zentrifugengläser werden 0.1 ml Tracer B einpipettiert. Für die Bestimmung der Gesamtaktivität (GA) werden in drei Reagensgläser je 0.9 ml Phosphat-Albumin-Puffer und 0.1 ml Tracer B einpipettiert. Alle Gläser werden 5 Sekunden lang geschüttelt (Vortex), mit Parafilm bedeckt und bei 4° C fünf Stunden lang inkubiert.

2.1.2.2.6. Trennung von freiem und gebundenem Testosteron

Die Dextran-Aktivkohle-Suspension wird im Eiswasserbad auf 0° C abgekühlt und mit einem elektromagnetischen Rührer (Cenco Instrumenten, Breda, Niederlande) in Suspension gehalten. Alle Gläser werden im Eiswasserbad auf 0° C abgekühlt. Aus der Suspension werden je 0.5 ml unter ständigem Rühren mit der Eppendorf-Pipette entnommen und in alle Gläser mit

Ausnahme der für die Bestimmung der GA transferiert. Mit einer Stoppuhr wird die Zeit genommen. Alle Gläser werden im Ständer 20 Sekunden kräftig geschüttelt und im Eiswasserbad genau 10 Minuten (Stoppuhr) inkubiert. Danach werden alle Gläser mit Ausnahme der für die Bestimmung der GA in eine Zentrifuge (Hettich, Rotixa K) gestellt und 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Beim Herausnehmen der Gläser aus der Zentrifuge ist darauf zu achten, daß die Gläser nicht mehr geschüttelt werden.

2.1.2.2.7. Messung des ^3H -Testosterons

In 63 Zählgefäße (New England Nuclear) werden mit einer Zipette je 10 ml der Szintillationsflüssigkeit gegeben. Aus allen Gläsern werden 0.75 ml vom Überstand mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und in die Zählgefäße transferiert. Die Zählgefäße werden verschlossen, 10 Sekunden geschüttelt (Vortex), auf 4°C abgekühlt und im Szintillationsspektrometer (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3003) 10 Minuten pro Probe gezählt.

Zählereinstellung:

	Gain	Window	Channel
Kanal I	5/4.75	0.50-10.0	on
Kanal II	5/7.1	0.50-10.0	on
Kanal III	6/2.8	10.0-unendl.	off
Reject:	off		
Time preset:	$10^3 \cdot 0.01$ min. bzw. $2 \cdot 10^3 \cdot 0.01$ min.		

Anmerkung: Bei Durchführung einer Quench-Korrektur (siehe 2.1.2.3.) wird der Kanal III auf Channel "on" gestellt, die Vorrichtung der automatic standardization auf "automatic".

2.1.2.3. Auswertung

Bei jedem Zählthroughgang wird der Gerätestandard (N) durch Zählung eines Zählgefäßes mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen.

N soll etwa 15 cpm betragen. Die Zählrate (Z) ergibt sich aus

$$Z = \frac{Z_{\text{Kanal I}} + Z_{\text{Kanal II}}}{2} \quad \text{--- N}$$

Anmerkung: In manchen Fällen ist es nützlich, die bei Messung von wässrigen Proben im Szintillationsmedium auftretende Schwächung der Zählraubeute zu berücksichtigen (Quench-Korrektur). Die korrigierte Zählrate $Z' = Z \cdot qf$,

wobei $qf = \frac{\text{Internal Standard der Automatic Standardization}}{\text{Internal Standard der Probe}}$

ist. In unserem Fall ist eine Quench-Korrektur nicht nötig, da bei Messung von 0.75 ml wässriger Phase $qf = 1.007$ und von 0.1 ml wässriger Phase $qf = 1.003$ beträgt, diese Faktoren nahezu invariabel sind und das Verhältnis der Zählraten zueinander praktisch nicht verändern.

Nacheinander werden folgende Berechnungen durchgeführt:

- 1) Aus den drei Messungen der GA Mittelwert bilden (Z_{GA}).
Davon die Zählraten der SB_O -Proben als Prozent berechnen:

$$SB_O = \frac{Z_{SB_O}}{Z_{GA}} \cdot 100 (\%)$$

- 2) Mittelwert der Zählraten der SB_O -Proben bilden ($Z_{\overline{SB_O}}$).
Davon die Zählraten der Standardproben (Z_{St}) und der Serumproben als Prozent berechnen:

$$B_{St} = \frac{Z_{St}}{Z_{\overline{SB_O}}} \cdot 100 (\%) \quad \text{und} \quad B_x = \frac{Z_x}{Z_{\overline{SB_O}}} \cdot 100 (\%)$$

- 3) Auf halblogarithmischem Papier (Schleicher und Schüll, Einbeck) werden die B_{St} -Werte samt ihrer Standardabweichung auf der linearen Ordinate für den entsprechenden Gehalt der Standardlösung in pg Testosteron auf der logarithmischen Abszisse eingetragen. Aus der Verbindungslinie dieser Punkte wird eine Standardkurve gezeichnet (Abb. 8).
- 4) Die B_x -Werte werden auf der Standardkurve als Testosteron-gehalt der Probe in pg (m_T) abgelesen.

- 5) Für die Berechnung des Wiederfindedefaktors (wf) wird das Mittel der Zählraten von 3 Messungen des Tracers A gebildet. Der 50. Teil dieses Wertes stellt die vollständige Wiederfindung dar. Mit der Zählrate der einzelnen Probe bei der Bestimmung der Wiederfindung (Z_{wf}) ist dann

$$wf = \frac{Z_{wf}}{(Z_{\text{Tracer A}}):50}$$

- 6) Die Testosteronkonzentration in ng/100 ml Serum der Probe (c_T) wird dann berechnet

$$c_T = \frac{1.25 \cdot m_T \cdot 100}{wf \cdot V_{\text{ext}}}$$

In dieser Formel bedeuten der Faktor 1.25 die Volumenkorrektur für die Abzweigung von 1/5 des gelösten Extrakts zur Bestimmung der Wiederfindung, m_T den Testosterongehalt der Probe in pg, wf den Wiederfindungsfaktor und V_{ext} das tatsächlich extrahierte Serumvolumen (z.B. Extraktion von 0.1 ml eines 1:5 verdünnten Serums: $V_{\text{ext}} = 20 \text{ ul}$).

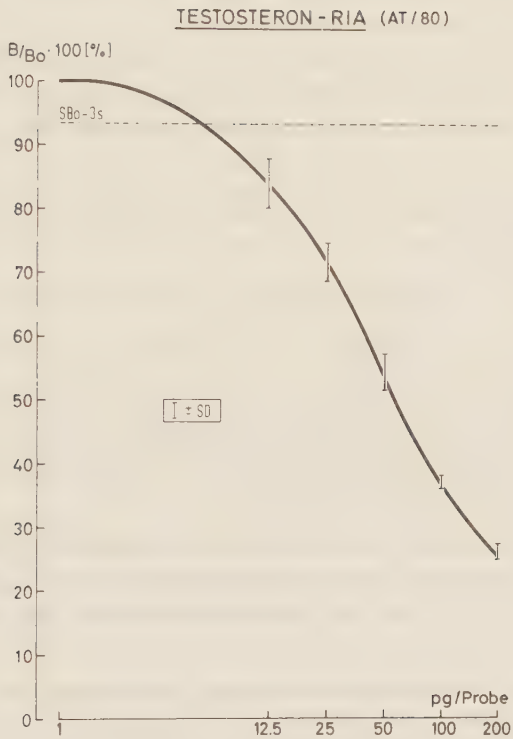


Abb. 8: Testosteron-Eichkurve in halblogarithmischer Auftragung.

2.1.2.4. Qualitätskontrolle

- 1) Der Wiederfindungsfaktor beträgt etwa $wf = 0.9$ (Wiederfindung von 90 %). Im Durchschnitt der Proben eines Ansatzes soll er 0.75 nicht unterschreiten.
- 2) Der SB_0 -Wert als Maß für die Bindungskapazität des Antiserums unter den gewählten Bedingungen beträgt $28.3 \pm 3.5 \%$ ($\bar{x} \pm s$). Er soll 20 % nicht unter- und 45 % nicht überschreiten.
- 3) Die untere Nachweisgrenze wird aus dem Mittelwert ($\overline{SB}_0$) und der dreifachen Standardabweichung der fünf SB_0 -Messungen definiert:

$$\frac{\overline{SB}_0 - 3 SD}{\overline{SB}_0} \cdot 100 (\%).$$

Dieser Wert beträgt $91.7 \pm 3.8 \%$ ($\bar{x} \pm s$) und wird auf der Eichkurve in pg Testosteron abgelesen: 6.8 ± 3.1 pg ($\bar{x} \pm s$). Werte unterhalb dieser Grenze werden als nicht sicher von Null unterscheidbar angesehen.

- 4) Der 50%-Intercept ist der Testosterongehalt einer Probe, bei dem 50 % des 3H -Testosterons vom Antiserum gebunden werden. Er wird an der Eichkurve abgelesen und beträgt unter den gewählten Bedingungen 67.2 ± 9.1 pg ($\bar{x} \pm s$).
- 5) Bei jedem Ansatz wird ein Kontrollserum bestimmt. Bei 22 Bestimmungen dieses Serums (Meßbereich 608 ng/100 ml) in einem Ansatz betrug der Variationskoeffizient 7.2 %, die Interassay-Varianz bei Bestimmung des selben Serums in 24 Ansätzen betrug 13.6 %.

2.2. Radioimmunologische LH-Bestimmung

Die Bestimmung der LH-Spiegel im Serum erfolgte nach einer radioimmunologischen Methode unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum, ^{125}J -LH und der Doppelantikörpermethode als Trennsystem. Die Referenzpräparation hat eine biologische Aktivität von 2135 IU/mg des 2nd IRP-HMG. Die Ergebnisse werden in Nanogramm dieser Standardpräparation ausgedrückt. Die Bestimmungsmethode weist keine Kreuzreaktionen mit hFSH, hTSH oder hGH auf. Der VK innerhalb eines Ansatzes beträgt 3.1 %, zwischen den Ansätzen 11.8 % (98).

2.3. Radioimmunologische FSH-Bestimmung

Die Bestimmung der FSH-Spiegel im Serum erfolgte nach einer radioimmunologischen Methode unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum, ^{125}J -FSH und der Doppelantikörpermethode als Trennsystem (104). Die Referenzpräparation hat eine biologische Aktivität von 3500 IU/mg des 2nd IRP-HMG, entsprechend einer radioimmunologischen Aktivität von 168 mg LER 907. Die Ergebnisse werden in Nanogramm dieser Standardpräparation ausgedrückt. Die Kreuzreaktion mit dem hTSH beträgt 2.5 %, die FSH-Bestimmung nur unerheblich beeinflussend (Abb. 9).

2.4. Radioimmunologische GH-Bestimmung

Die Bestimmung der Wachstumshormonspiegel im Serum erfolgte nach einer radioimmunologischen Methode (104) unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum, ^{125}J -Wachstumshormon und der Doppelantikörpermethode als Trennsystem. Die Referenzpräparation (hGH-NIH HS/394) hat eine biologische hGH-Aktivität von 2 IE/mg und eine biologische Prolaktinaktivität von 6 IE/mg. Kreuzreaktion trat nur mit hPL auf und betrug weniger als 0.5 %. Die GH-Werte werden in Nanogramm der Referenzpräparation angegeben.



Abb. 9: FSH-Eichkurve mit Kreuzreaktionen: Verdrängung durch hTSH-Standardpräparation (rechte Kurve) und Verdünnungsreihe eines hypothyreoten Serums (mittlere Kurve).

2.5. Radioimmunologische PRL-Bestimmung

Die Bestimmung der Prolaktinspiegel im Serum erfolgte nach einer radioimmunologischen Methode (104) unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum, ^{125}J -Prolaktin und der Doppelantikörpermethode als

Trennsystem. Die Referenzpräparation (VLS-hPRL) hat eine biologische Prolaktinaktivität von 28 IE/mg und eine GH-Aktivität von 0.2 USPE. Kreuzreaktion trat nur mit hGH auf und blieb unter 0.2 %. Die PRL-Werte werden in Mikroeinheiten des MRC-Standards A 71/222 angegeben (1 ng VLS-hPRL = 20 uE MRC-A 71/222).

2.6. Radioimmunologische TSH-Bestimmung

Die Bestimmung der TSH-Spiegel im Serum erfolgte nach einer spezifischen radioimmunologischen Methode unter Verwendung von Kaninchen-Antiserum, ¹²⁵J-TSH und der Doppelantikörpermethode als Trennsystem. Die Angabe der TSH-Werte erfolgt in Mikroeinheiten des NIMR-Standards 68/38 Mill-Hill.

2.7. Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH)

2.7.1. Intravenöse Verabreichung von GnRH

Je acht männlichen Normalpersonen und hypogonaden Patienten wurde an zwei verschiedenen Tagen um 8.30 Uhr synthetisches GnRH (LHRH Hoechst) in Dosen von jeweils 25 ug und 100 ug in Form einer schnellen intravenösen Injektion verabreicht. Bei den Normalpersonen wurde zwischen beiden Testtagen ein Abstand von etwa einer Woche eingehalten, bei den hypogonaden Patienten die beiden Tests an aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Durch einen Katheter in der Vorderarmvene wurde 15 Minuten und unmittelbar vor, sowie 15, 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten nach Applikation von GnRH Blut entnommen. Die Vene wurde durch eine langsam tropfende Infusion von physiologischer Kochsalzlösung offengehalten und Grundumsatzbedingungen eingehalten. 480 Minuten (acht Stunden) nach GnRH-Applikation wurde erneut aus einer Vorderarmvene Blut entnommen.

In allen Proben aus den intravenösen GnRH-Testen an den Normalpersonen wurden die Serumspiegel von LH, FSH, GH und Testosteron bestimmt. Bei fünf der acht Normalpersonen wurden zusätzlich

die Serumspiegel von PRL und TSH bestimmt. In den Proben der hypogonaden Patienten wurden die LH- und FSH-Spiegel in allen, die Testosteronspiegel in den Proben zu den Zeitpunkten 0, 120, 240 und 480 Minuten bestimmt.

2.7.2. Intranasale Verabreichung von GnRH

Drei Normalpersonen erhielten 1, 2 bzw. 5 Tropfen einer Lösung von 5 mg synthetischem GnRH (LHRH Hoechst) in 0.5 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Nasenhöhle instilliert. Blutabnahmezeiten und Testbedingungen waren die gleichen wie beim intravenösen GnRH-Test.

In den Proben der intranasalen GnRH-Teste wurden die Serumspiegel von LH und FSH in allen, die von Testosteron zu den Zeitpunkten 0, 120, 240 und 480 Minuten bestimmt.

3. PATIENTEN

3.1. Normalpersonen

Bei acht gesunden Männern im Alter von 22 bis 28 Jahren wurden die intravenösen GnRH-Teste, bei drei gesunden Männern im Alter von 18, 23 und 47 Jahren die intranasalen GnRH-Teste durchgeführt. Bei keinem der Probanden wurde anamnestisch und klinisch eine Störung im Hypophysen-Gonaden-System festgestellt.

3.2. Hypogonade Patienten

3.2.1. Patienten mit primären
Hypogonadismus

J.H., 38 Jahre

Konsultationsgrund: Infertilität
Größe 165 cm, Gewicht 66 kg
Hoden: etwa 2 x 2 cm
Penis und Scrotum: normal
Sekundärbehaarung: +
Geschlechtschromatin: negativ
Spermatogramm: Azoospermie, Fructose 570 ug/ml
(Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Venerologie der Universität München,
Direktor: Prof.Dr.O. Braun-Falco)
Sella: Exkavation des Sellabodens
Übrige Achsen: o.B.

R.K., 28 Jahre

Konsultationsgrund: Infertilität
Größe 166 cm, Gewicht 70 kg
Hoden: etwa 0,5 x 1 cm
Penis und Scrotum: normal
Sekundärbehaarung: +
Geschlechtschromatin: negativ
Spermatogramm: Azoospermie, Fructose 3100 ug/ml
(Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Venerologie der Universität München,
Direktor: Prof.Dr. O. Braun-Falco)
Anamnese: Parotitis epidemica als Kind
Übrige Achsen: o.B.

O.H., 34 Jahre

Konsultationsgrund: Vegetative Beschwerden
Größe 180 cm, Gewicht 86 kg
Hoden: o.B. palpatorisch
Penis und Scrotum: normal
Sekundärbehaarung: +
Libido und Potenz: vermindert
Geringgradige Gynäkomastie beidseits
Geschlechtschromatin: positiv
Chromosomenanalyse: 47, XXY
Übrige Achsen: Blande Struma diffusa I

V.E., 15 Jahre

Konsultationsgrund: Hodenatrophie rechts
Anamnese: Parotitis epidemica vor einem Jahr
Hoden: rechts nicht palpabel, links o.B.
Pubertät eingetreten
Keine weiteren Befunde

A.R., 17 Jahre

Konsultationsgrund: Kontrolle nach Entfernung eines
intra- und suprasellär wachsenden Hypophysentumors
vor vier Jahren.
Anamnese: nach Op. Wachstumsstillstand, Eintritt der
Pubertät
Größe 164 cm, Gewicht 54 kg
Hoden: o.B.
Penis und Scrotum: o.B.
Sekundärbehaarung: ++
Übrige Achsen: o.B.
Augen: Okulomotoriusparese li., abgeblaßte Papille li.

3.2.2. Patienten mit sekundärem
Hypogonadismus

R.F., 17 Jahre

Konsultationsgrund: nicht eingetretene Pubertät
Größe 155 cm, Gewicht 85.5 kg, Adipositas permagna
Hoden: links 4 x 3 cm, rechts 3 x 2.5 cm
Penis und Scrotum: infantil
Sekundärbehaarung: Schambehaarung vom femininen Typ,
sonst fehlend
Deutliche Gynäkomastie beidseits
Geschlechtschromatin: negativ
Sella: o.B.
Übrige Achsen: episternale euthyreote Struma

G.R., 21 Jahre

Konsultationsgrund: Vegetative Beschwerden
Geschlechtschromatin: negativ
Hoden: 1 x 1.5 cm beidseits
Penis und Scrotum: hypoplastisch
Libido und Potenz: vermindert
Anamnese: Pubertät mit 16.5 Jahren
Spermatogramm: keine Samenflüssigkeit zu gewinnen.

F.H., 25 Jahre

Konsultationsgrund: V.a. Panhypopituitarismus
Größe 163 cm, Gewicht 73 kg
Hoden: links 1 x 1.5 cm, rechts fraglich
Penis und Scrotum: infantil
Sekundärbehaarung: Pubes vom femininen Typ,
sonst fehlend
Geringgradige Gynäkomastie beidseits
Geschlechtschromatin: negativ
Übrige Achsen: sekundäre Hypothyreose, sekundäre
Nebennierenrindeninsuffizienz

4. ERGEBNISSE

4.1. Normalbereich der Testosteronspiegel

Bei den elf im Rahmen der GnRH-Teste untersuchten männlichen Normalpersonen lag die Serumkonzentration von Testosteron bei 688.6 ± 110.1 ng/100 ml ($\bar{x} \pm s$); hierbei wurde für die einzelnen Probanden je ein mittlerer Basalwert aus allen vor GnRH-Applikation gemessenen Testosteronwerten zugrundegelegt. Die Annahme, daß die Stichprobenwerte einer normalverteilten Grundgesamtheit mit diesen Parametern entstammen, ist berechtigt (Kolmogoroff-Smirnow-Test (71), $p < 0.01$). Der Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) reicht von 468 ng/100 ml bis 909 ng/100 ml.

Die Basalwerte schwankten in einem weiten Bereich, von 463 bis 1192 ng/100 ml. Auch innerhalb des gleichen Tests unterschieden sich die beiden vor GnRH-Gabe gemessenen Werte mitunter beträchtlich: der 15-Minuten-Wert reichte in Prozent des Basalwertes von 82.9 % bis 153.3 %. Bei den acht Normalpersonen, an denen zwei GnRH-Teste durchgeführt wurden, bestand eine Korrelation der Basalspiegel an den beiden Testtagen ($r = +0.73$, $p < 0.025$).

Bestimmungen von Frauenserum wurden nicht in größerem Umfang durchgeführt, da die Anwendung der beschriebenen Methode in diesem Fall problematisch ist (siehe 5.1.). Fünf zur Kontrolle bestimmte Seren endokrin gesunder Frauen ergaben Testosteronwerte zwischen 32 und 77 ng/100 ml.

4.2. 25 und 100 µg GnRH i.v. bei Normalpersonen

4.2.1. Serum-LH-Spiegel

Die LH-Basalwerte der acht männlichen Normalpersonen lagen in einem Bereich von 1.4 bis 3.4 ng/ml, im Mittel 2.04 ± 0.45 ng/ml ($\bar{x} \pm s$). Der Serum-LH-Spiegel zeigte nach intravenöser Verabreichung von 25 und 100 µg GnRH einen steilen Anstieg, die Gipfelwerte wurden bei beiden GnRH-Dosen in der Regel nach 30 Minuten erreicht (Tab. 2). Der Netto-Anstieg des Serum-LH

($\Delta LH = LH_{\max} - LH_0$) unterlag beträchtlichen individuellen Schwankungen. Nach 25 ug GnRH i.v. betrug das ΔLH zwischen 1.6 und 6.3 ng/ml, im Mittel 3.43 ± 1.58 ng/ml ($\bar{x} \pm s$), nach 100 ug GnRH i.v. zwischen 2.4 und 6.8 ng/ml, im Mittel 4.50 ± 1.47 ng/ml ($\bar{x} \pm s$). Zwischen dem ΔLH nach 25 ug GnRH und dem nach 100 ug GnRH bestand eine positive Korrelation ($r = +0.69$, $p < 0.025$).

Die LH-Werte waren noch 240 Minuten nach der Stimulation mit den beiden von uns angewendeten Dosen signifikant höher als die 0-Werte (gepaarter t-Test: 25 ug GnRH: $p < 0.025$; 100 ug GnRH: $p < 0.005$). Jedoch führten 100 ug GnRH i.v. zu einem stärkeren Anstieg des Serum-LH, das ΔLH war nach dieser Dosis signifikant größer als das nach 25 ug GnRH (gepaarter t-Test: $p < 0.05$) (Abb. 10).

4.2.2. Serum-FSH-Spiegel

Die basalen FSH-Werte streuten über einen weiten Bereich, von 0.7 bis 3.5 ng/ml, im Mittel betrugen sie 1.94 ± 0.83 ng/ml ($\bar{x} \pm s$) (Tab. 3). Sie streuten damit stärker als die entsprechenden LH-Werte.

Ferner war die prozentuelle Zunahme des Serum-FSH nach Stimulation mit den beiden GnRH-Dosen geringer als beim LH (Abb. 10). Der höchste Anstieg trat mit 100 ug GnRH regelmäßig in der 60. Minute auf (Tab. 3), das $\Delta FSH (= FSH_{\max} - FSH_0)$ betrug zwischen 0.7 und 4.0 ng/ml, im Mittel 1.69 ± 1.08 ng/ml ($\bar{x} \pm s$). Hingegen waren nach 25 ug GnRH die Gipfelwerte über eine längere Zeit, 30 bis 240 Minuten nach GnRH-Applikation, verteilt (Tab. 3). Das ΔFSH betrug von 0.4 bis 3.5 ng/ml, im Mittel 1.24 ± 1.03 ng/ml ($\bar{x} \pm s$) und war auf dem 5%-Niveau kleiner als das ΔFSH nach Stimulation mit 100 ug GnRH (gepaarter t-Test). Zwischen den ΔFSH nach den beiden Dosen bestand eine noch deutlichere Korrelation als beim ΔLH ($r = +0.91$, $p < 0.001$).

Mit der höheren Dosis waren noch die 240-Minuten-Werte, mit der niedrigeren nur noch die 180-Minuten-Werte signifikant größer

Tab. 2: LH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Normalpersonen.

Zeit	25 µg GnRH i.v.										$\bar{x}$	S
	W.R., 28.J.	W.K., 25.J.	R.W., 23.J.	J.K., 22.J.	L.M., 26.J.	G.K., 24.J.	S.G., 24.J.	H.H., 23.J.				
-15	2.0	2.4	3.4	2.0	2.2	1.6	2.1	1.5	2.150	0.585		
0	2.0	2.1	2.7	1.7	1.9	1.4	2.0	1.4	1.900	0.421		
15	5.8	6.6	6.6	8.0	4.1	3.2	3.5	2.8	5.075	1.922		
30	6.1	5.7	5.8	7.7	4.2	4.2	3.6	3.3	5.075	1.498		
60	4.2	4.3	4.6	5.8	3.2	3.8	2.7	2.6	3.900	1.068		
120	3.0	4.1	3.2	4.4	2.8	2.9	2.9	2.3	3.200	0.701		
180	2.3	3.2	3.3	4.2	2.4	1.9	2.1	1.9	2.663	0.823		
240	2.4	2.6	3.1	2.8	1.9	1.6	1.9	2.0	2.288	0.519		
480	1.8	-	2.5	2.4	1.7	1.5	2.5	1.9	2.043	0.416		
	100 µg GnRH i.v.											
-15	2.0	2.6	2.3	1.7	2.8	1.4	1.8	2.3	2.113	0.473		
0	1.9	2.5	2.0	-	2.4	1.7	1.7	1.8	2.000	0.326		
15	5.7	6.7	8.8	6.2	4.8	6.2	4.4	4.9	5.963	1.400		
30	6.5	7.8	6.6	7.1	3.9	6.6	5.0	4.8	6.038	1.323		
60	6.1	8.0	6.0	6.7	3.6	5.7	4.0	4.3	5.550	1.494		
120	4.9	5.4	2.5	4.1	3.7	5.4	3.0	3.8	4.100	1.072		
180	3.2	4.2	3.0	3.2	2.7	3.7	2.7	2.0	3.088	0.669		
240	2.5	3.6	2.6	2.6	2.7	2.5	2.0	1.7	2.525	0.555		
480	2.1	4.0	2.0	2.4	2.1	3.3	2.5	1.6	2.500	0.782		

Tab. 3: FSH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Normalpersonen.

Zeit	25 ug GnRH i.v.								$\bar{x}$	S
	W.R., 28 J.	W.K., 25 J.	R.W., 23 J.	J.K., 22 J.	L.M., 26 J.	G.K., 24 J.	S.G., 24 J.	H.H., 23 J.		
-15	1.6	3.4	0.8	2.2	2.3	1.6	1.3	2.3	1.938	0.793
0	1.7	3.0	0.7	1.9	1.9	1.4	1.3	2.4	1.788	0.702
15	2.4	4.4	0.9	3.2	2.3	1.9	1.3	2.6	2.375	1.095
30	2.7	4.7	1.1	3.8	2.5	2.1	1.5	3.1	2.688	1.181
60	2.9	4.6	1.0	4.0	2.3	2.5	1.6	3.0	2.738	1.178
120	2.5	4.8	1.0	3.5	2.3	2.3	1.6	3.3	2.663	1.187
180	2.5	4.3	1.0	4.6	2.2	1.9	1.7	3.0	2.650	1.257
240	2.1	3.4	1.0	5.4	2.2	1.8	1.4	3.2	2.563	1.408
480	1.6	-	0.8	2.3	1.8	1.6	1.4	2.9	1.771	0.670
100 ug GnRH i.v.										
-15	1.8	3.1	0.7	3.3	2.5	1.3	1.3	2.6	2.075	0.939
0	1.5	2.9	0.7	3.5	2.6	1.3	1.0	2.1	1.950	0.988
15	3.4	3.5	1.3	5.2	2.9	1.9	1.5	2.6	2.788	1.277
30	3.6	4.0	1.4	6.0	3.0	2.6	1.8	3.1	3.188	1.427
60	3.8	4.3	1.3	7.5	3.5	3.3	1.9	3.3	3.613	1.856
120	3.4	4.2	1.2	7.4	2.3	2.6	2.0	3.3	3.300	1.898
180	2.9	4.2	1.1	6.6	2.7	2.5	1.7	3.0	3.088	1.690
240	2.8	4.3	1.1	5.4	2.6	2.1	1.6	2.8	2.838	1.407
480	2.2	3.5	0.9	2.7	2.5	1.8	1.6	2.5	2.215	0.786

Tab. 4: Testosteron-Werte (ng/100 ml) vor und nach GnRH bei Normalpersonen.

Zeit	W.R., 28 J.	W.K., 25 J.	R.W., 23 J.	25 ug GnRH i.v.				S.G., 24 J.	S.G., 24 J.	H.H., 23 J.	$\bar{x}$	S
				J.K., 22 J.	L.M., 26 J.	G.K., 24 J.	S.G., 24 J.					
-15	729	731	484	616	699	852	577	730	677.3	113.7		
0	679	790	573	670	843	555	463	703	659.5	125.4		
15	632	849	587	527	770	742	507	690	663.0	121.1		
30	696	787	575	492	1038	659	533	708	686.0	172.7		
60	582	970	510	603	820	763	451	720	677.4	172.8		
120	776	1016	584	720	993	998	543	809	804.9	186.2		
180	924	1211	528	851	890	856	640	803	837.9	202.2		
240	812	1037	566	845	1051	1220	664	815	871.8	211.5		
480	637	-	626	522	577	647	508	780	613.9	91.6		
				100 ug GnRH i.v.								
-15	538	1192	506	571	754	903	873	790	765.9	229.9		
0	560	882	523	682	685	922	725	673	706.5	138.8		
15	498	921	489	431	622	1025	792	594	671.5	217.5		
30	561	878	591	520	666	947	704	768	704.4	152.1		
60	493	991	484	609	702	996	862	497	704.3	219.5		
120	761	1034	641	888	590	879	660	641	761.8	157.1		
180	722	1260	417	490	423	679	482	858	666.5	287.5		
240	813	1410	530	998	559	938	506	996	843.5	309.9		
480	760	1012	484	560	579	418	722	802	667.1	194.1		

Tab. 5: GH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Normalpersonen.

[illegible]

Tab. 6: PRL-Werte (uU/ml) vor und nach GnRH bei Normalpersonen.

Zeit	25 ug GnRH i.v.				$\bar{x}$	S
	W.R., 28. J.	W.K., 25. J.	R.W., 23. J.	J.K., 22. J.		
-15	258	200	287	114	406	253.0
0	259	178	229	91	312	213.8
15	237	307	236	75	285	228.0
30	227	224	243	81	283	211.6
60	318	175	209	81	198	196.2
120	193	163	179	79	200	162.8
180	185	161	163	99	191	159.8
240	177	182	184	87	173	160.6
480	228	-	148	118	290	196.0
<u>100 ug GnRH i.v.</u>						
-15	297	245	253	120	799	342.8
0	229	196	218	110	679	286.4
15	236	206	228	114	661	289.0
30	240	243	196	106	566	270.2
60	223	235	187	130	428	240.6
120	215	165	168	156	354	211.6
180	215	204	178	173	250	204.0
240	280	200	241	105	287	222.6
480	220	444	218	112	387	276.2

1
3
1

Tab. 7: TSH-Werte (uU/ml) vor und nach GnRH bei Normalpersonen.

Zeit	25 ug GnRH i.v.					$\bar{x}$	S
	W.R., 28 J.	W.K., 25 J.	R.W., 23 J.	J.K., 22 J.	L.M., 26 J.		
-15	0.1	0.46	0.1	0.39	1.19	0.448	0.446
0	0.1	0.42	0.17	0.1	0.84	0.326	0.316
15	0.1	0.50	0.81	0.1	0.55	0.412	0.308
30	0.1	0.36	0.1	0.1	0.65	0.262	0.244
60	0.1	0.36	0.12	0.5	0.57	0.330	0.214
120	0.1	0.70	0.1	0.1	0.49	0.298	0.281
180	0.1	0.52	0.1	0.54	0.63	0.378	0.257
240	0.1	0.40	0.1	0.1	0.63	0.266	0.241
480	0.1	-	0.1	0.42	0.57	0.298	0.236
100 ug GnRH i.v.							
-15	0.1	0.92	0.12	0.1	1.38	0.524	0.594
0	0.1	0.38	0.1	0.1	1.12	0.360	0.442
15	0.1	0.40	0.1	0.1	0.75	0.290	0.288
30	0.1	0.53	0.11	0.1	0.81	0.330	0.326
60	0.1	0.1	0.1	0.1	0.68	0.216	0.259
120	0.1	0.65	0.24	0.1	0.61	0.340	0.271
180	0.1	0.52	0.11	0.1	0.37	0.240	0.194
240	0.1	0.44	0.1	0.1	0.62	0.272	0.244
480	0.1	0.50	0.1	0.45	0.65	0.360	0.248

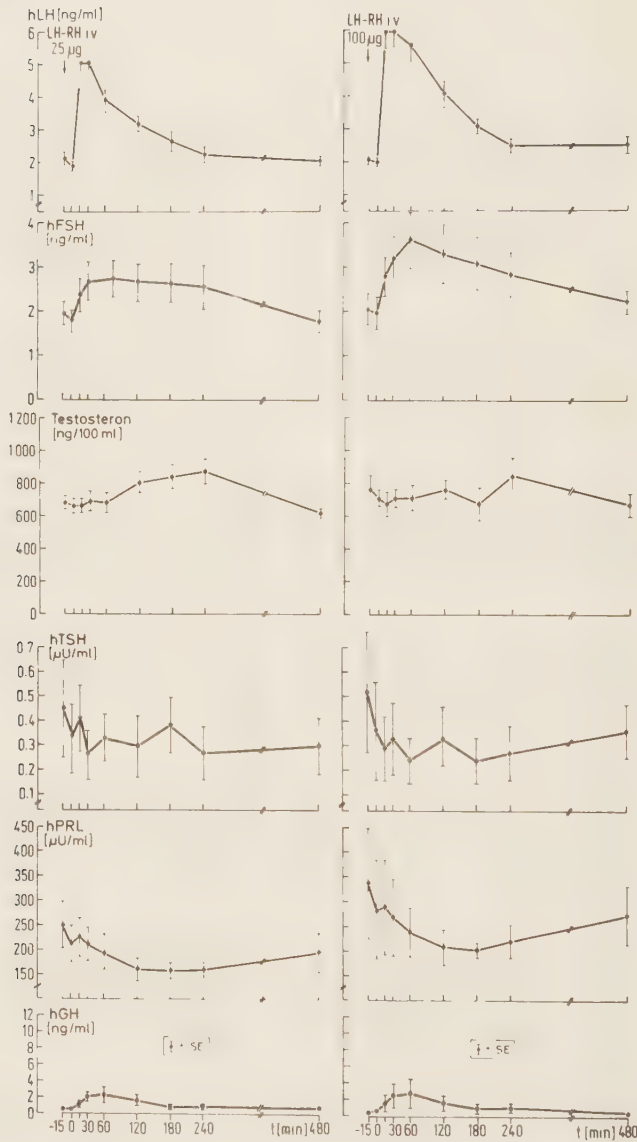


Abb. 10: Serumspiegel von LH, FSH, Testosteron, TSH, PRL und GH nach 25 und 100 µg GnRH i.v.

als die Basalwerte zum Zeitpunkt 0 (gepaarter t-Test: $p < 0.005$ bzw. $p < 0.02$) (Abb. 10).

4.2.3. Serum-Testosteronspiegel

Nach 25 ug GnRH wurden bei allen Probanden über die Basalwerte erhöhte Testosteronspiegel gefunden. Mit einer Ausnahme (R.W.) wurden die höchsten Testosteronwerte im Zeitraum zwischen 180 und 240 Minuten beobachtet (Tab. 4). Die Maximalwerte schwankten in einem Bereich von 664 bis 1220 ng/100 ml, d.h. zwischen 115.9 und 219.8 % des Basalwerts. Im gepaarten t-Test unterschieden sich die Gipfelwerte signifikant von den Basalwerten ($p < 0.01$). Die 120-, 180- und 240-Minuten-Werte waren auf dem 2%-Niveau ebenfalls signifikant größer als die Werte zum Zeitpunkt 0 (gepaarter t-Test) (Abb. 11).

Nach 100 ug GnRH i.v. traten bei fünf Probanden die höchsten Serumtestosteronwerte in dem Zeitraum zwischen 120 und 240 Minuten auf (Tab. 4). Bei den restlichen drei (L.M., G.K., S.G.) wurde der höchste Testosteronwert vor der 30. Minute beobachtet, die Testosteronspiegel fielen von der 60. zur 180. Minute hin ab (Tab. 4). Die Gipfelwerte schwankten in einem Bereich von 641 bis 1410 ng/100 ml, in Prozent des zugehörigen Basalwertes zwischen 102.4 und 159.8 %. Auch waren die höchsten nach GnRH-Applikation beobachteten Testosteronwerte gegenüber dem 0-Wert signifikant größer (gepaarter t-Test: $p < 0.01$). Die Werte zum Zeitpunkt 0 zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zu denen der übrigen Abnahmezeiten (Abb. 11).

Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (71) waren die Serumtestosteronwerte nach 25 ug GnRH i.v. zu den Zeiten 180 und 240 gegenüber allen Werten vor der Stimulation signifikant größer ($p < 0.005$). Im Gegensatz dazu ließen sich mit dem gleichen Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den basalen Werten und den Testosteronspiegeln, die 60 bis 240 Minuten nach 100 ug GnRH i.v. gefunden wurden, nachweisen.

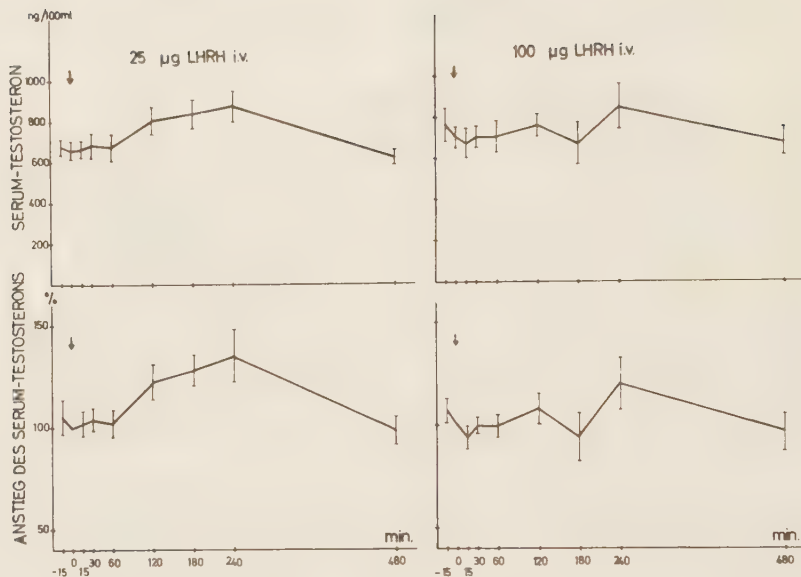


Abb. 11: Serum-Testosteron-Spiegel nach 25 und 100 µg GnRH i.v.

Die Testosteronwerte, die 480 Minuten nach Verabreichung beider GnRH-Dosen gemessen wurden, unterschieden sich nicht von den basalen Werten und schwankten im gleichen Bereich wie die Werte vor der Stimulation (45.3 bis 135.7 % des Basalwertes).

Der Nettoanstieg der Testosteron-Gipfelwerte über die Basalwerte ist nicht mit dem Δ LH des zugehörigen Testes korreliert ($r = +0.09$).

4.2.4. Serumspiegel von GH, PRL und TSH

Die Serumspiegel von GH, PRL und TSH lagen im Normbereich gesunder Männer und zeigten keine signifikanten Veränderungen nach der Verabreichung beider GnRH-Dosen (Abb. 10).

Einige der Normalpersonen (W.K., R.W., L.M., G.K., S.G.) zeigten während der Teste Anstiege der GH-Spiegel von unterschiedlichem Ausmaß (bei R.W. bis zu 14.1 ng/ml) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tab. 5). Bei drei der Normalpersonen (W.K., R.W., G.K.) erfolgte ein solcher GH-Anstieg in den Tests mit beiden GnRH-Dosen zu etwa dem gleichen Zeitpunkt (60 bzw. 120 Minuten), in diesen Fällen war der GH-Anstieg im Test mit 100 ug GnRH höher als in dem mit 25 ug GnRH. Ein signifikanter Anstieg nach der GnRH-Applikation im Normalkollektiv wurde jedoch beim GH nicht gefunden.

4.3. Intranasale Applikation von GnRH bei Normalpersonen

Die intranasale Verabreichung von 5 Tropfen einer 1%igen GnRH-Lösung bei einem Probanden (R.Sch.) führte zu einem Anstieg des Serum-LH-Spiegels von 1.8 ng/ml auf 6.6 ng/ml innerhalb von 60 Minuten nach der Stimulation (Δ LH = 4.8 ng/ml). Das Serum-FSH stieg innerhalb von 120 Minuten von 1.7 ng/ml auf 3.2 ng/ml an (Δ FSH = 1.5 ng/ml). Der Serumtestosteronspiegel betrug zum Zeitpunkt 0 650 ng/100 ml, zu den Zeiten 120, 240 und 480 Minuten wurden Werte zwischen 793 und 835 ng/100 ml gemessen (Abb. 12).

Nach intranasaler Verabreichung von 2 Tropfen der gleichen GnRH-Lösung stiegen die Serum-LH-Werte um 1.6 ng/ml über den O-Wert an, der höchste Wert trat in der 30. Minute auf. Die Serum-FSH-Spiegel zeigten nach dieser Dosis geringe Veränderungen, die maximale Abweichung zweier FSH-Werte (Δ FSH) betrug 0.5 ng/ml. Der Testosteronwert dieses Probanden (W.S.) war basal 742 ng/100 ml, zum Zeitpunkt 120 Minuten wurden 1138 ng/100 ml gemessen, die 240- und 480-Minuten-Werte lagen zwischen diesen beiden Extremwerten (Abb. 2).

Nach intranasaler Instillation von 1 Tropfen der GnRH-Lösung (Proband J.E.) stieg der Serum-LH-Spiegel in 30 Minuten um 1.4 ng/ml über den Basalwert an. Das Δ FSH betrug 0.4 ng/ml, die Testosteronspiegel schwankten in einem Bereich von 511 ng/100 ml bis 596 ng/100 ml (Abb. 2).

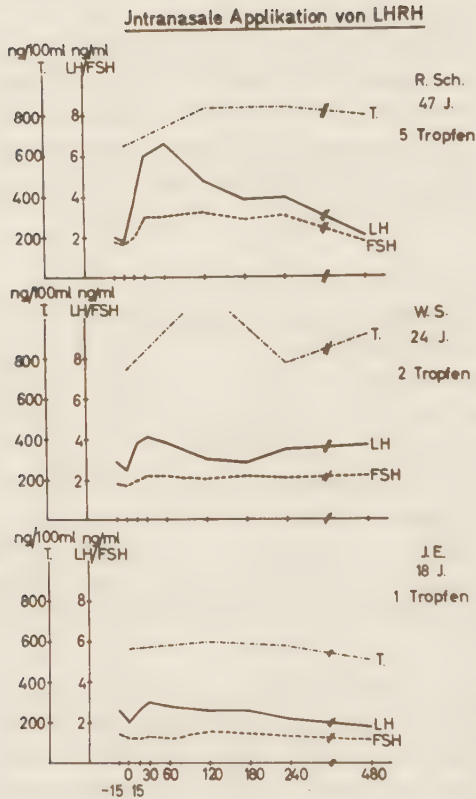


Abb. 12: Intranasale Applikation von GnRH bei Normalpersonen.

4.4 GnRH bei hypogonaden Patienten

4.4.1. GnRH bei Patienten mit primärem Hypogonadismus

4.4.1.1. Serum-LH und -FSH vor und nach GnRH-Stimulation

Der Normalbereich der basalen LH-Werte, definiert als $\bar{x} \pm 2s$ im Normalkollektiv, reicht von 1.0 bis 3.0 ng/ml. Die LH-Basalwerte der Patienten J.H., R.K., O.H. und A.R. waren demgegenüber auf etwa das Doppelte bis Zweieinhalbfache erhöht. Die LH-Basalwerte des Patienten V.F. lagen dagegen im Normalbereich (Tab. 8).

Nach Stimulation mit 25 ug GnRH i.v. stiegen bei den beiden Patienten mit nachgewiesener Azoospermie (J.H., R.K.) die Serum-LH-Werte um 8.4 bzw. um 6.8 ng/ml an; dieser Anstieg war deutlich höher als das ΔLH des Normalkollektivs (Abb.13). Mit 100 ug GnRH i.v. wurde bei diesen beiden Patienten mit einem ΔLH von 8.8 bzw. 5.8 ng/ml nur noch eine geringe bzw. keine Steigerung des ΔLH mehr erreicht. Mit 6.8 bzw. 8.0 ng/ml war das ΔLH nach beiden GnRH-Dosen auch bei dem Patienten A.R. deutlich erhöht. Bei den Patienten O.H. und V.E. dagegen lag das ΔLH nach beiden Dosen jeweils im Normalbereich; es war nach der höheren Dosis auch jeweils höher (Tab. 8).

Die basalen FSH-Spiegel der Patienten streuten noch stärker als die des Normalkollektivs (Tab. 9). Die Werte des Patienten V.E. lagen innerhalb des Normalbereichs, der von 0.3 bis 3.5 ng/ml reicht ($\bar{x} \pm 2s$), in diesem Fall war auch das ΔFSH nach beiden GnRH-Dosen normal. Bei dem Patienten A.R. waren die basalen FSH-Werte von durchschnittlich 4.0 ng/ml mit GnRH i.v. in normalem Ausmaß zu stimulieren. Auf das acht- bis siebzehnfache der Norm erhöht waren die FSH-Basalwerte der Patienten J.H., R.K. und O.H. (Tab. 9). In diesen Fällen war auch das ΔFSH nach 25 ug GnRH i.v. mit 29.7, 18.7 bzw. 6.8 ng/ml wesentlich höher als bei den Normalpersonen, bei denen nach dieser Dosis ein durchschnittlicher Anstieg von 1.2 ± 1.0 ng/ml ($\bar{x} \pm s$) erfolgte.

Tab. 8: LH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Patienten mit primärem Hypogonadismus.

		<u>25 ug GnRH i.v.</u>								
		-15	0	15	30	60	120	180	240	480
J.H.,										
38 J.		3.7	3.9	11.4	12.3	10.8	10.2	7.6	6.5	5.9
R.K.,										
28 J.		5.1	5.7	12.5	8.1	5.8	4.5	6.0	5.0	4.6
O.H.,										
34 J.		5.9	4.8	7.2	7.4	7.0	6.1	5.2	5.5	5.7
V.E.,										
15 J.		2.8	2.5	4.2	4.2	3.5	2.9	2.4	2.1	2.2
A.R.,										
17 J.		4.2	4.0	9.6	10.8	9.8	5.6	5.2	4.4	4.2

		<u>100 ug GnRH i.v.</u>								
J.H.,										
38 J.		4.0	4.3	13.1	12.6	10.5	9.6	8.6	8.4	6.7
R.K.,										
28 J.		6.5	4.3	10.1	7.1	6.1	5.9	6.1	5.8	4.9
O.H.,										
34 J.		5.1	4.8	9.4	8.0	6.7	8.1	6.7	6.5	6.3
V.E.,										
15 J.		2.3	1.8	4.6	4.9	4.8	3.5	2.5	2.3	2.1
A.R.,										
17 J.		4.2	3.8	7.8	12.0	11.6	7.4	5.6	4.6	4.4

Tab. 9: FSH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Patienten mit primärem Hypogonadismus.

		<u>25 ug GnRH i.v.</u>								
		-15	0	15	30	60	120	180	240	480
J.H.,										
38 J.		18.6	15.3	36.1	45.0	41.7	38.0	29.4	25.9	24.9
R.K.,										
28 J.		37.1	31.6	35.3	40.3	36.9	33.4	33.1	31.5	33.4
O.H.,										
34 J.		20.5	17.0	20.4	21.8	23.8	21.2	20.0	19.8	20.7
V.E.,										
15 J.		3.6	2.9	3.6	4.0	3.4	3.7	3.4	3.2	3.3
A.R.,										
17 J.		4.4	4.4	4.2	4.7	4.9	4.6	4.7	4.4	4.8

		<u>100 ug GnRH i.v.</u>								
J.H.,										
38 J.	16.6	16.0	34.7	43.7	41.9	40.3	37.0	33.6	29.7	
R.K.,										
28 J.	38.6	28.8	39.5	39.6	39.4	37.3	34.1	38.4	39.3	
O.H.,										
34 J.	21.1	19.4	20.3	22.7	26.1	25.4	23.7	22.2	22.3	
V.E.,										
15 J.	3.3	2.9	3.9	4.4	5.0	4.6	3.4	3.6	3.7	
A.R.,										
17 J.	4.4	4.0	4.5	4.5	5.0	4.4	4.9	5.1	5.6	

Tab. 10: Testosteron-Werte (ng/100 ml) vor und nach GnRH bei Patienten mit primärem Hypogonadismus.

<u>25 ug GnRH i.v.</u>				
	0	120	240	480 min.
J.H., 38 J.	539	498	549	596
R.K., 28 J.	369	488	497	389
O.H., 34 J.	457	507	594	504
V.E., 15 J.	490	582	468	531
A.R., 17 J.	544	595	632	536

<u>100 ug GnRH i.v.</u>				
J.H., 38 J.	501	676	557	751
R.K., 28 J.	400	430	457	338
O.H., 34 J.	351	464	500	706
V.E., 15 J.	500	632	545	607
A.R., 17 J.	585	596	694	666

Regelmäßig war bei diesen drei Patienten mit 100 ug GnRH i.v. kein höherer FSH-Anstieg als mit der kleineren Dosis zu erzielen (Tab. 9).

Als weiterer Parameter läßt sich das Verhältnis der Basalspiegel beider Hormone zueinander berechnen, nämlich als

$$\text{FSH/LH-Quotient} = \frac{\text{FSH}_{\text{basal}} \text{ in ng/ml}}{\text{LH}_{\text{basal}} \text{ in ng/ml}} .$$

Dieser Quotient reicht bei den Normalpersonen von 0.5 bis 1.7. Bei den Patienten V.E. und A.R. war der Quotient mit 1.3 bzw. 1.1 normal. Mit 4.1, 6.3 bzw. 3.8 war das Verhältnis der Basalwerte von FSH und LH bei den Patienten J.H., R.K. und O.H. dagegen deutlich verschoben.

4.4.1.2. Serum-Testosteronspiegel

Die Grenzen des Normalbereichs, definiert als $\bar{x} \pm 2s$ im Normalkollektiv, reichen von 468 bis 909 ng/100 ml. Bei den Patienten J.H., V.E. und A.R. lagen alle acht bestimmten Testosteronwerte innerhalb dieser Grenzen (Tab. 10). Sie waren allerdings überwiegend an der Untergrenze der Norm bzw. außerhalb der einfachen Standardabweichung (Abb. 13).

Bei dem Patienten R.K. lagen sechs von acht Werten außerhalb des Normalbereichs, beim Patienten O.H. drei von acht Werten (Tab.10). Die übrigen Werte dieser beiden Patienten waren im unteren Normalbereich.

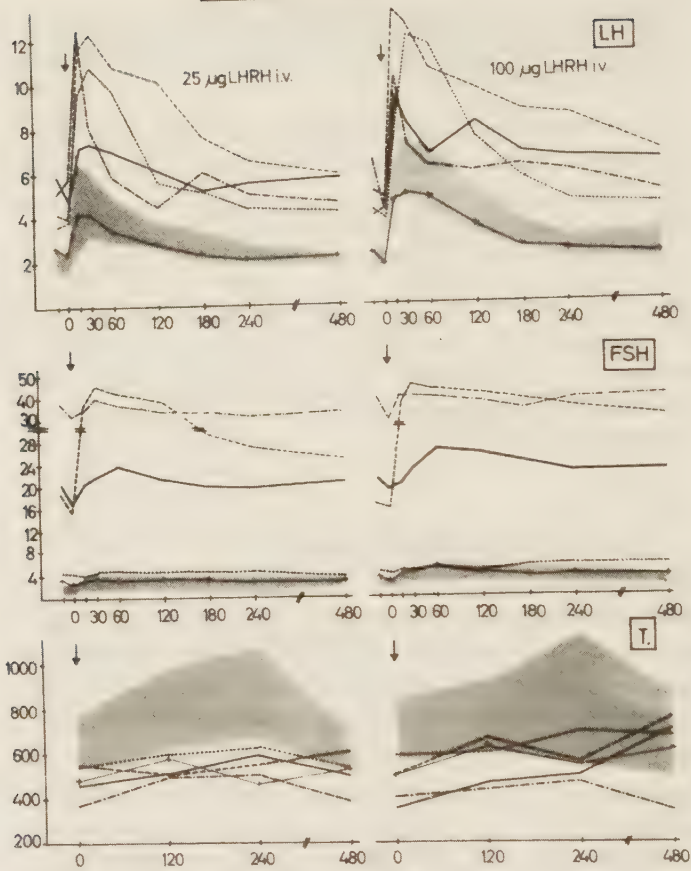
4.4.2. GnRH bei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus

4.4.2.1. Serum-LH und -FSH vor und nach GnRH-Stimulation

Von den basalen LH-Werten lagen nur die des Patienten F.H. mit 0.8 ng/ml unterhalb der unteren Normgrenze von 1.0 ng/ml, die der beiden übrigen im unteren Normalbereich (Tab. 11).

Alle drei Patienten zeigten nur geringe Anstiege der Serum-

Primärer Hypogonadismus



----- J.H., 38 J.

+--+ V.E., 15 J.

-.-. R.K., 28 J.

.... A.R., 17 J.

— O.H., 33 J.

Abb. 13: GnRH-Test bei Patienten mit primärem Hypogonadismus: Die schattierte Fläche zeigt den Bereich, in dem die Werte $\bar{x} + s$ des Normalkollektivs liegen. Die Linien verbinden die Meßwerte der Serumspiegel von LH, FSH und Testosteron vor und nach GnRH-Stimulation bei den Patienten. Man beachte den Maßstab bei den FSH-Werten!

LH-Spiegel nach Stimulation mit GnRH. Beim Patienten R.F. betrug das Δ LH nach 25 ug GnRH i.v. 1.6 ng/ml, nach 100 ug GnRH i.v. 2.2 ng/ml, der Anstieg war demnach weniger als halb so groß wie der des Durchschnitts des Normalkollektivs. Beim Patienten G.R. betrugen die entsprechenden Werte 2.0 bzw. 3.2 ng/ml und waren damit an der Untergrenze der Norm (Abb.14). Praktisch kein Anstieg der LH-Spiegel nach GnRH-Gabe wurde bei F.H. festgestellt: Selbst nach 100 ug GnRH i.v. schwankten die Serum-LH-Spiegel nur um 0.4 ng/ml nach oben (Tab. 11).

Die Grenzen des Normalbereichs der basalen FSH-Spiegel ($\bar{x} \pm 2s$) sind mit 0.3 ng/ml bis 3.5 ng/ml weit gesteckt, die Werte aller drei Patienten lagen innerhalb dieser Grenzen (Tab. 12), die von R.F. allerdings eine Standardabweichung unter dem Mittelwert des Normalkollektivs, die von F.H. darunter (Abb. 14). Ein deutliches Ansteigen der FSH-Spiegel nach GnRH-Gabe wurde bei den Patienten R.F. und F.H. nicht beobachtet, bei dem Patienten G.R. fiel es mit 0.8 bzw. 1.0 ng/ml nach den beiden GnRH-Dosen gering aus (Abb. 14).

Der FSH/LH-Quotient war bei R.F. und G.R. mit 1.0 und 1.1 innerhalb der im Normalkollektiv gefundenen Variationsbreite, bei F.H. dagegen war das Verhältnis beider Hormone bei einem Quotienten von 0.3 zugunsten der LH-Spiegel verschoben.

4.4.2.2. Serum-Testosteronspiegel

Bei einer unteren Nachweisgrenze von 20 ng/100 ml wurde bei F.H. kein Testosteron im Serum gefunden. Die Bestimmungen der Serum-Testosteronspiegel des Patienten R.F. ergaben alle deutlich unterhalb der Norm liegende Werte. Von acht bei dem Patienten G.R. bestimmten Werten lagen sechs unterhalb des Normalbereichs, zwei an dessen unterer Grenze (Tab. 13).

Tab. 11: LH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus.

		<u>25 ug GnRH i.v.</u>								
		-15'	0'	15'	30'	60'	120'	180'	240'	480'
R.F.,										
17 J.		0.9	0.8	2.4	2.4	1.7	1.4	1.2	1.2	0.8
G.R.										
21 J.		1.5	1.3	3.3	3.0	2.7	2.0	1.6	1.5	1.5
F.H.,										
25 J.		1.8	1.6	2.2	2.2	2.2	-	-	1.8	1.8

		<u>100 ug GnRH i.v.</u>							
R.F., 17 J.	0.8	0.8	3.0	2.7	2.8	1.7	1.5	1.1	0.8
G.R., 21 J.	1.5	1.2	4.4	3.9	3.6	2.6	1.7	1.6	1.3
F.H., 25 J.	2.0	1.8	2.2	2.2	2.2	2.2	2.0	2.0	1.8

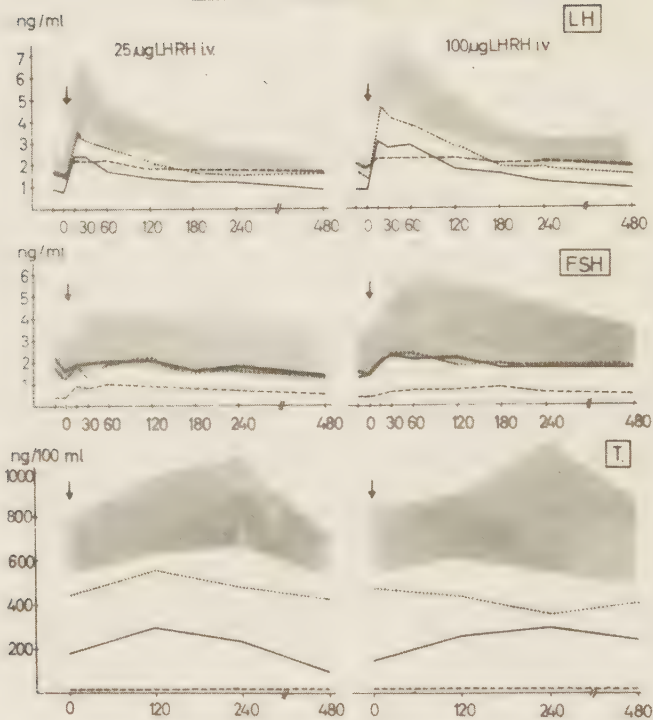
Tab. 12: FSH-Werte (ng/ml) vor und nach GnRH bei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus.

		<u>25 ug GnRH i.v.</u>								
		-15'	0'	15'	30'	60'	120'	180'	240'	480'
R.F.,										
17 J.		1.2	0.9	1.1	1.1	1.2	1.2	0.9	1.0	0.8
G.R.,										
21 J.		1.7	1.3	1.8	1.4	1.8	2.1	1.5	1.6	1.4
F.H.,										
25 J.		0.5	0.5	0.9	0.8	1.0	-	-	0.7	0.5
		<u>100 ug GnRH i.v.</u>								
R.F.,										
17 J.		0.7	0.7	1.1	1.3	1.2	1.2	0.9	1.0	0.9
G.R.,										
21 J.		1.5	1.4	2.0	2.4	2.4	1.8	1.9	1.9	1.8
F.H.,										
25 J.		0.5	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.6	0.5

Tab. 13: Testosteron-Werte (ng/100 ml) vor und nach GnRH
bei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus.

		<u>25 ug GnRH i.v.</u>			
		0'	120'	240'	480'
R.F.,					
17 J.	192	296	235	94	
G.R.,					
21 J.	431	547	477	420	
F.H.,					
25 J.	20	20	20	20	
		<u>100 ug GnRH i.v.</u>			
R.F.,					
17 J.	150	258	298	142	
G.R.,					
21 J.	460	427	346	405	
F.H.,					
25 J.	20	20	20	20	

Sekundärer Hypogonadismus



----- R.F., 17 J.

----- F.H., 26 J.

..... G.R., 21 J.

Abb. 14: GnRH-Test bei Patienten mit sekundärem Hypogonadismus: Die schattierte Fläche zeigt den Bereich, in dem die Werte ($\bar{x} \pm s$) des Normalkollektivs liegen. Die Linien verbinden die Meßwerte der Serumspiegel von LH, FSH und Testosteron vor und nach GnRH-Stimulation bei den Patienten.

5. DISKUSSION

5.1. Testosteronbestimmung

Die Serumtestosteronkonzentrationen bei den von uns untersuchten Normalpersonen sind in der Größenordnung und in ihrer statistischen Variabilität mit den in der Literatur mitgeteilten Werten vergleichbar (3, 17, 37, 49, 64, 73, 82, 97, 110). In Tabelle 14 sind Normalwerte für Männer, mit unterschiedlichen Methoden gewonnen, zusammengestellt.

Tab. 14: Normalwerte der Serumtestosteronspiegel von Männern mit verschiedenen Bestimmungsmethoden.

Autor	Methode	$\bar{x} \pm 2$ (ng/100 ml)	(Bereich)
(26)	Fluorometrie	500	(100 - 1800)
(51)	Isotopenverdünnung	740 ± 260	(440 - 1300)
(14)	Gaschromatographie	690	(410 - 1060)
(74)	Kompetitive Proteinbindung (CPBA)	662	(250 - 1000)
(2)	17-OH-Androgene: CPBA ohne Chromatographie	870	(330 - 2150)
(39)	RIA, Extraktion aus Globulinfraktion	596 ± 202	(330 - 790)
(31)	RIA, Al_2O_3 -Säulenchromatographie	590 ± 149	(365 - 815)
(23)	RIA, Dünnschichtchromatographie	709 ± 143	(450 - 1100)
hier	RIA, ohne Chromatographie	689 ± 110	(463 - 1192)

Die übrigen Androgene, die eine zu berücksichtigende Kreuzreaktion mit dem Testosteron in unserer Bestimmungsmethode aufweisen, sind physiologischerweise im Serum von Männern in

weit geringeren Konzentrationen vorhanden als das Testosteron (Tab. 15). Bei Frauen und präpuberalen Kindern sind davon wesentlich verschiedene Konzentrationsverhältnisse festzustellen (Tab. 15). Bei Knaben gleichen sich die Konzentrationsverhältnisse der Androgene im Serum im Verlauf der Pubertät denen von Männern allmählich an (54). Dies gilt besonders für den Δ_4 -Androstendion/Testosteron-Quotienten.

Tab. 15: Serumkonzentrationen der mit dem Testosteron kreuz-reagierenden Steroidhormone.

Steroidhormon	Kreuz- reaktion	Serumspiegel (ng/100 ml)			
		Männer	Frauen	Knaben	Mädchen
Testosteron (101)	100 %	670	65	42	19
Dihydrotestosteron (42, 87)	71 %	56	18	0	0
Androstandiol (50)	11 %	14	2	0	0
Androstendion (29)	8 %	77	160	86	30
Androstendiol (21, 81)	8 %	117	65	-	-

Die hohe Empfindlichkeit der Testosteronbestimmungsmethode erlaubte uns, von gesunden Männern eine sehr kleine Serummenge, nämlich 0.01 ml, zur Testosteronbestimmung einzusetzen. Auf diese Weise wurde die Konzentration der übrigen Androgene, die eine Kreuzreaktion mit dem Testosteron aufwiesen, unter der Nachweisgrenze der Methode gehalten, mit Ausnahme des DHT, das vorwiegend aus peripherer Konversion am Wirkort des Testosterons entsteht (41, 60). Veränderungen der Serumkonzentration des DHT laufen parallel zu solchen des Testosterons (63, 75).

Bei Frauen und Kindern wird wegen des niedrigeren Serumtestosteronspiegels eine vielfache Menge Serum zur Bestimmung benötigt. Ein Verzicht auf chromatographische Abtrennung des Testosterons ist im Gegensatz zu der Bestimmung von Männerseren nicht ohne Folgen

für die Spezifität. Weiterhin ist zu bedenken, daß unter pathologischen Bedingungen das Konzentrationsverhältnis der verschiedenen Androgene im Serum gestört sein kann. Unter solchen Voraussetzungen erhält man mit der beschriebenen Methode einen Parameter für den Gesamt-Androgenspiegel im Serum, nicht einen Wert für den Serumtestosteronspiegel.

5.2. Stimulation der LH- und FSH-Sekretion durch GnRH bei Normalpersonen; Spezifität

Das synthetische Dekapeptid GnRH stimuliert Synthese und Sekretion sowohl von LH wie von FSH (47, 72, 84, 89, 109). 25 und 100 ug GnRH i.v. führen nach 30 Minuten zum LH- und nach 60 Minuten zum FSH-Maximum. Eine zeitliche Verschiebung der maximalen Sekretion zwischen beiden GnRH-Dosen läßt sich nicht feststellen. Erwartungsgemäß ist die Stimulation von LH sowohl nach 25 ug als auch nach 100 ug GnRH wesentlich stärker ausgeprägt als die von FSH. Die Sekretionshöhe von LH und FSH ist im Bereich zwischen 25 und 100 ug GnRH dosisabhängig. Die jeweiligen Anstiege sind individuell stark verschieden, korrelieren aber bei beiden Testen am selben Probanden. Dies weist auf die individuell unterschiedliche Empfindlichkeit der Hypophyse für exogen zugeführtes GnRH hin (77).

Die Untersuchungen mit intranasaler Applikation von GnRH bestätigen, daß das Dekapeptid auch von den Schleimhäuten resorbiert wird und auf diesem Wege verabreicht wirksam ist (1, 32). Die Höhe der Stimulation nach intranasaler Verabreichung von fünf Tropfen einer 1%igen GnRH-Lösung ist der einer 100 ug i.v.-Injektion etwa äquivalent, der Sekretionsgipfel tritt jedoch gegenüber der Injektion zeitlich verzögert auf.

Die Serumspiegel der anderen Hypophysenvorderlappenhormone TSH, GH und PRL zeigen nach GnRH-Applikation keine signifikanten Veränderungen. Synthetisches GnRH ist also ein für die Gonadotropine spezifisches Releasing-Hormon. Ebenso kann eine Prolaktin-Sekretion-inhibierende Aktivität von GnRH nicht nachgewiesen werden (20, 48). Die bei drei der von uns getesteten Normal-

personen festgestellten GH-Anstiege ähneln Anstiegen der Serum-GH-Spiegel nach GnRH-Injektion, wie sie bisher bei akromegalen Patienten beobachtet worden waren (25, 85, 104). Ein signifikanter Anstieg der Serum-GH-Spiegel nach GnRH-Applikation bei Normalpersonen erfolgt jedoch nicht.

5.3. Serumtestosteronspiegel nach 25 ug und 100 ug GnRH i.v.

Bei den acht Normalpersonen fanden sich nach 25 ug GnRH i.v. signifikant höhere Testosteronwerte in der Zeit zwischen 120 und 240 Minuten nach GnRH im Vergleich zu den Basalspiegeln (gepaarter Student-Test). Das Sekretionsmaximum wurde zwischen 180 und 240 Minuten erreicht. Auch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (71) sind die Werte im Zeitraum von 120 bis 240 Minuten gegenüber allen anderen gemessenen Werten erhöht. Im Gegensatz dazu ist das Verhalten der Serumtestosteronspiegel nach Stimulation der LH-Sekretion mit 100 ug GnRH i.v. nicht einheitlich. Bei fünf der acht Normalpersonen zeigt sich ein Sekretionsmaximum in der Zeit zwischen 120 und 240 Minuten, bei den übrigen drei vor der 30. Minute, bei zwei sogar vor der GnRH-Stimulation. In diesem Fall fand sich auch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test keine signifikante Testosteron-Mehrsekretion nach GnRH.

Die synchrone und signifikante Erhöhung des Testosteronspiegels nach 25 ug i.v. spricht für eine echte Stimulation der Testosteronsekretion im Zeitraum von 120 bis 240 Minuten durch das nach der GnRH-Injektion freigesetzte LH. Das Zeitintervall zwischen dem Gipfel der LH-Sekretion und dem Anstieg der Serumtestosteronspiegel beträgt etwa 90 Minuten. Dies stimmt sowohl mit den Ergebnissen von JUDD et al. (46), als auch mit Befunden über den zeitlichen Abstand zwischen episodischer LH-Sekretion und Testosteronanstiegen überein (45, 69, 86). Dazu im Einklang stehen auch Ergebnisse über Testosteronanstiege am narkotisierten Hund nach arteriellen LH-Infusionen (24). ROTH et al. (83) fanden maximale Testosteronspiegel 240 Minuten nach GnRH-Applika-

tion, während SCHWARZSTEIN et al. (91) signifikante Erhöhungen des Serumtestosterons bereits acht bis sechzehn Minuten nach GnRH-Injektionen beobachteten, wobei die Testosteronspiegel allerdings über die 128. Minute hinaus erhöht blieben.

Die fehlende signifikante Erhöhung der Serumtestosteronspiegel nach 100 ug GnRH i.v. in unserem Kollektiv bedarf jedoch der Erklärung. Auch JUDD et al. (46) fanden trotz Steigerung der GnRH-Dosis bei einem Teil ihrer Probanden keinen Sekretionsgipfel. Diese Autoren nehmen eine refraktäre Periode der Leydig'schen Zellen gegen LH-Stimulation an. Da die LH-Sekretion episodisch erfolgt (12, 70, 98), könnte die GnRH-Injektion bzw. die hierdurch stimulierte LH-Sekretion mit einer solchen Refraktärperiode der Testosteronsekretion zusammenfallen. In diesem Falle dürfte man allerdings dieses Verhalten nicht nur bei einer bestimmten GnRH-Dosis beobachten. Wir konnten mit 25 ug GnRH i.v. im Durchschnitt 90 Minuten nach dem LH-Gipfel regelmäßig erhöhte Testosteronwerte feststellen, während dies mit 100 ug GnRH ausblieb.

Man könnte überhaupt in Frage stellen, ob eine Stimulation der Testosteronsekretion nach diesen GnRH-Dosen stattfindet. KLEY et al. (52) fanden nach einmaliger Injektion verschiedener GnRH-Dosen einen Abfall der Serumtestosteronspiegel über acht Stunden entsprechend der circadianen Schwankung der Testosteronproduktion (9, 40, 97), dagegen einen Anstieg nach achtstündiger Infusion von 300 ug GnRH. Die Tatsache, daß in unseren Befunden die Schwankungsbreite der Werte vor und nach Stimulation von der selben Größenordnung ist, könnte ebenfalls gegen die Annahme einer Stimulation der Testosteronsekretion sprechen. Diese erheblichen Fluktuationen der Testosteronspiegel wären vielmehr als Folge der episodischen Sekretion dieses Hormons anzusehen, denn ähnlich anderen Hormonen scheint eine arhythmische, stoßweise Sekretion des Testosterons vorzuliegen (68, 69, 86, 105).

Die fehlende signifikante Erhöhung der Testosteronspiegel nach

100 ug GnRH i.v. allein darf jedoch nicht als Beweis einer nicht stattgefundenen Stimulation aufgefaßt werden. Es ist möglich, daß der Gipfel der Testosteronsekretion bei den weit auseinanderliegenden Blutentnahmezeiten bei einigen Probanden der Beobachtung entgangen ist. Häufigere Blutentnahmen zur Bestimmung des Testosterons im Serum in kürzeren Zeitabständen könnten diese Frage beantworten. Ein verlässlicher Test zur Beurteilung der Leydig-Zell-Funktion mit Hilfe einmaliger GnRH-Injektionen ist nach den vorliegenden Befunden jedenfalls nicht zu begründen.

5.4. Der GnRH-Test in der Diagnostik des primären Hypogonadismus.

Bei den beiden Patienten mit Azoospermie und bei dem Patienten mit Klinefelter-Syndrom (53) wurden erhöhte Basalspiegel von LH und FSH und eine erhöhte Ansprechbarkeit auf exogenes GnRH gefunden (94). Besonders auffallend ist die im Vergleich zu den LH-Spiegeln disproportional stärkere Erhöhung der Serum-FSH-Spiegel (Abb. 10). Dieser Befund wurde inzwischen auch von anderen Autoren bei Patienten mit verschiedenen Störungen der Spermatogenese erhoben (22, 27, 38, 108, 111). Offensichtlich besteht für FSH und LH eine getrennte Regulation, obwohl auch Testosteron an der Kontrolle der FSH-Sekretion beteiligt zu sein scheint (10, 15, 36, 57, 93). Andererseits wurde der Serum-FSH-Spiegel mit dem Grad einer Tubuluschädigung korreliert und hieraus die Existenz eines noch hypothetischen Tubulusfaktors postuliert, der an der Regulation der FSH-Sekretion beteiligt ist (11, 28, 44, 55, 59, 100). Für die endokrinologische Diagnostik ist nach unseren Befunden die Messung von FSH-Spiegeln beim GnRH-Test von großer Bedeutung.

Weiterhin ist die Tatsache, daß auch bei den Patienten mit Azoospermie erhöhte LH-Werte gefunden werden, von klinischem Interesse. Bei diesen Patienten scheint demnach nicht nur eine selektive tubuläre Hodenstörung, sondern auch eine Störung der Leydig-Zell-Funktion vorzuliegen, deren Ausdruck die

Erhöhung der LH-Werte ist (56, 65). Bei einem unserer Patienten reicht diese Kompensation aus, um einen noch normalen Testosteronspiegel aufrecht zu erhalten.

Bei dem 15jährigen Patienten, der ein Jahr nach einseitiger Hodenatrophie als Folge einer Parotitis epidemica untersucht wurde, waren alle endokrinologischen Befunde normal. Der nicht geschädigte Hoden hält eine normale Funktion aufrecht.

Bei dem Patienten mit einem nach Entfernung eines Hypophysenadenoms aufgetretenen Hypogonadismus wurden erhöhte Basalwerte von LH und FSH gefunden, jedoch keine überschießende Stimulation durch GnRH und normale Testosteronwerte. Es fehlt auch die bei den Patienten mit echtem primären Hypogonadismus charakteristische Verschiebung des FSH/LH-Quotienten. Hier muß angenommen werden, daß die fehlende episodische LH-Sekretion nach operativer Schädigung des Hypophysenvorderlappens zu einem sekundären Hypogonadismus geführt hat. Die noch normalen Testosteronspiegel könnten noch dadurch aufrecht erhalten werden, daß die Hypophyse die LH-Basalsekretion anheben kann, was einen hypergonadotropen, also primären Hypogonadismus vortäuscht. Erst der GnRH-Test und die Mitbestimmung des FSH decken den Sachverhalt auf. Zur Bestätigung der richtigen Interpretation dieser Befunde wären allerdings weitere andrologische Untersuchungen (Spermatogramm, Hodenbiopsie) erforderlich.

5.5. Der GnRH-Test in der Diagnostik des sekundären Hypogonadismus

Die drei Patienten in dieser Gruppe zeigen im Vergleich zum Normalkollektiv niedrige LH-Werte, wenngleich nur in einem Fall die basalen LH-Werte deutlich unterhalb der unteren Normgrenze sind. Die Testosteronbestimmung dokumentiert bei allen drei Patienten ein Androgendefizit unterschiedlichen Ausmaßes (Abb. 15).

Eine nähere Differenzierung gelingt mit dem GnRH-Test. Bei zwei Patienten steigen die LH-Werte nach beiden Dosen GnRH dosisabhängig an, wenn auch jeweils unzureichend. Der GnRH-Test beweist hier eine hypophysäre Gonadotropinreserve, die durch exogenes GnRH mobilisiert werden kann. Der Ort der Störung liegt deshalb auf hypothalamischer Ebene. Zwischen den beiden Patienten dieser Gruppe besteht ein gradueller Unterschied. Bei dem 17jährigen Patienten sind keine klinischen Zeichen der Pubertät vorhanden, nach den von AUGUST et al. (4) erarbeiteten Kriterien ist sein Entwicklungsstand etwa in das Pubertätsstadium P.2 einzuordnen, das einem Skeletalter von 12 Jahren entspricht. Bei dem 21jährigen Patienten war die Pubertät mit 16.5 Jahren eingetreten, bei ihm wurden höhere LH-Basalwerte, ein höheres Δ LH und ein geringeres Androgendefizit gefunden. Der Begriff "Pubertas tarda" stellt keine ätiologische Diagnose dar. Die unzureichende Stimulation der Gonaden bei erhaltener hypophysärer Gonadotropinreserve ordnet beide Patienten dem Syndrom der isolierten Gonadotropininsuffizienz zu, bei dem die Störung in den meisten Fällen auf hypothalamischer Ebene zu suchen ist (43, 99).

Im Gegensatz dazu läßt sich bei dem Patienten mit Panhypopituitarismus mit dem GnRH-Test keine Gonadotropinreserve nachweisen. Der GnRH-Test bestätigt hier zusammen mit der Prüfung der anderen Funktionsachsen den hypophysären Ort der Schädigung (16). Der Testosteronspiegel dieses Patienten lag unter der Nachweisgrenze der Methode und beweist das vollständige Fehlen der Stimulation der Gonaden (79) (Abb. 15).

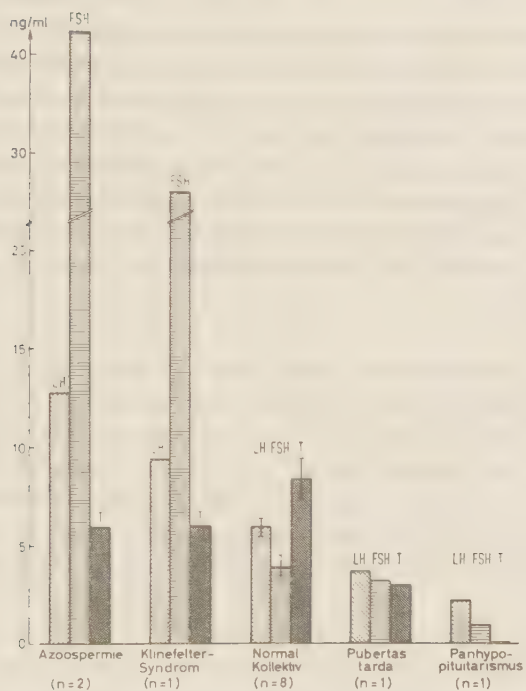


Abb. 15: Serumspiegel von LH, FSH und Testosteron nach GnRH-Stimulation bei Normalpersonen und hypogonaden Patienten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Eine einfache und praktikable Methode für die Bestimmung von Testosteron im Serum wird beschrieben. Durch die Steigerung der Empfindlichkeit kann auf den chromatographischen Trennungsschritt verzichtet werden, ohne daß bei der Bestimmung von männlichen Seren die Spezifität entscheidend beeinträchtigt wird. Bei der Serumtestosteronbestimmung von Frauen, präpuberalen Kindern und hypogonaden Patienten erlaubt die Methode allein die Beurteilung des Gesamt-Androgenspiegels. Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode sind befriedigend.

6.2. Synthetisches GnRH führt zu einer signifikanten, dosisabhängigen und spezifischen Steigerung der Sekretion von LH und FSH. Der Einfluß auf die LH-Sekretion ist ausgeprägter als der auf die FSH-Sekretion, der Gipfel der LH-Sekretion tritt im Mittel nach 30 Minuten, der der FSH-Sekretion nach 60 Minuten auf. Die Serumspiegel von TSH, GH und PRL werden nicht beeinflusst. GnRH ist auch bei intranasaler Anwendung wirksam.

6.3. Während die Injektion von 25 µg GnRH zu einer signifikanten Steigerung der Serumtestosteronspiegel 120 bis 240 Minuten nach der Injektion führte, wird mit der Dosis von 100 µg GnRH kein signifikantes Ergebnis erzielt. Die möglichen Erklärungen für dieses paradoxe Verhalten werden diskutiert. Ein Funktionstest für die gesamte Hypophysenvorderlappen-Gonaden-Achse ergibt sich deshalb nicht.

6.4. Der GnRH-Test ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Differentialdiagnose des männlichen Hypogonadismus. Bei Patienten mit primären Gonadenstörungen (Klinefelter-Syndrom und Azoospermie) erweist sich die exzessive Erhöhung der Serum-FSH-Spiegel und der überproportionale Anstieg der FSH-

Werte nach GnRH als wichtiges Kriterium. Zusätzliche Bestimmungen der LH-Werte vor und nach GnRH-Applikation, sowie der Serumtestosteronspiegel können den Verdacht einer Leydig-Zell-Schädigung erhärten. In Fällen mit sekundärem Hypogonadismus gelingt mit dem GnRH-Test die Differenzierung nach dem Ursprung der Störung: Anstieg des Serum-LH-Spiegels nach GnRH-Injektion weist auf hypothalamischen Ursprung hin, das Ausbleiben des Anstiegs auf hypophysären Ursprung. FSH-Bestimmungen sind hier von geringerer Bedeutung. Testosteronbestimmungen sind ein Gradmesser für das Ausmaß des sekundären Hypogonadismus.

SUMMARY

INFLUENCE OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE ON THE GONADOTROPIN AND TESTOSTERONE SECRETION IN NORMAL AND HYPOGONAD SUBJECTS

1) A simple and practicable method for the estimation of serum testosterone has been described. Because of sufficient sensitivity of the assay chromatographic procedures were not necessary without affecting the sensitivity of estimating male testosterone levels. The method allows only the estimation of total androgens in females, prepubertal children or hypogonad patients. Precision and reproducibility of the method are satisfactory.

2) Synthetic GnRH stimulates specifically the secretion of LH and FSH in a dose-response relationship. The influence upon LH is more pronounced than on FSH-secretion. The peak of LH-secretion occurs in the average 30 minutes, of FSH-secretion 60 minutes after GnRH-administration. The serum levels of TSH, GH and PRL are not influenced. GnRH is also efficient by intranasal administration.

3) The injection of 25 ug GnRH resulted in a significant increase of serum testosterone levels after 120 to 240 minutes, whereas no significant result could be obtained with the dose of 100 µg GnRH. Possible explanation for this paradoxical phenomenon are discussed. Therefore no test for the entire anterior pituitary-gonadal axis could be established.

4) GnRH-test is of important value in the differential diagnosis of male hypogonadism. The excessive elevation of

basal FSH-levels and the exaggerated increase of FSH-levels after GnRH-administration are important criteria in the diagnosis of primary gonadal failure. Additional estimations of serum LH- and testosterone-levels often reveal an additional insufficiency of Leydig cell function. In cases with secondary gonadal failure the GnRH-test allows the differentiation of the origin: Increase of serum LH-levels after GnRH-injection suggests hypothalamic, lack of increase pituitary origin of the failure. Estimation of FSH-levels is in those cases of less significance. Estimation of serum testosterone levels demonstrates the degree of secondary gonadal dysfunction.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AMOSS, M., J.RIVIER, R.GUILLEMIN:
Release of gonadotropins by oral administration
of synthetic LRF or a tripeptide fragment of LRF.
J.clin.Endocr. 35 : 175, 1972
2. ANDERSON, D.C.:
A simple and clinically useful method for
plasma testosterone-like substances by competi-
tive protein binding.
Clin.Chim.Acta 29 : 513, 1970
3. AUGUST, G.F., M.TKATCHUK, M.M.GRUMBACH:
Plasma testosterone-binding affinity and
testosterone in umbilical cord plasma, late
pregnancy, prepubertal children, and adults.
J.clin.Endocr. 29 : 891, 1969
4. AUGUST, G.F., M.M.GRUMBACH, S.L.KAPLAN:
Hormonal changes in puberty. III. Correlation
of plasma testosterone, LH, FSH, testicular
size, and bone age with male pubertal develop-
ment.
J.clin.Endocr. 34 : 319, 1972
5. BABA, Y., H.MATSUO, A.V.SCHALLY:
Structure of porcine LH- and FSH-releasing
hormone. II. Confirmation of the proposed struc-
ture by conventional sequential analysis.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 44 : 459, 1971
6. BARDIN, C.W., G.T.ROSS, A.R.RIFKIND, C.M.CARGILLE,
M.B.LIPSETT:
Studies of the pituitary - leydig cell axis in
young men with hypogonadotropic hypogonadism
and hyposmia: Comparison with normal men, pre-
pubertal boys, and hypopituitary patients.
J.clin.Invest. 48 : 2046, 1969
7. BARDIN, C.W., G.T.ROSS, M.B.LIPSETT:
Site of action of clomiphen citrate in men:
A study of the pituitary - leydig cell axis.
J.clin.Endocr. 27 : 1558, 1967
8. BINOUX, M.A., W.D.ODELL:
Use of dextrane-coated charcoal to separate anti-
body-bound from free hormone: A critique.
J.clin.Endocr. 36 : 303, 1973

9. BODENHEIMER, S., J.S.D. WINTER, C.FAUMAN:
Diurnal rhythm of serum gonadotropins,
testosterone, estradiol, and cortisol in
blind men.
J.clin.Endocr. 37 : 472, 1973
10. BÖRSCH, G., J. MAUSS, E. RICHTER, K.BORMACHER,
G.LEYENDECKER, W.NOCKE:
The role of testosterone in the feedback
control of male FSH and LH secretion.
Klin.Wschr. 53 : 237, 1975
11. BÖRSCH, G., M.HETT, J.MAUSS, H.SCHACH, J.SCHEIDT:
Excretion of immunochemically assayable FSH
and LH and quantitative analysis of germinal
epithelium in man.
Andrologie 5 : 317, 1973
12. BOYAR, R., M.PERLOW, L.HELLMANN, S. KAPEN, E.WEITZMANN:
Twenty-four hour pattern of luteinizing hormone
secretion in normal men with sleep stage recording.
J.clin.Endocr. 35 : 73, 1972
13. BREUER, H. (Ref.):
Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungs-
methoden zur Bestimmung von Steroidhormonen.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11 : 357, 1973
14. BROWNIE, A.C., H.J. van der MOLEN, E.E.NISHIZAWA,
K.B. EIK-NES:
Determination of testosterone in human peri-
pheral blood using gas-liquid chromatography
with electron capture detection.
J.clin.Endocr. 24 : 1091, 1964
15. CAPELL, P.T., C.A.PAULSEN:
The effect of exogenous testosterone upon serum
FSH and LH concentrations in normal males.
Contraception 6 : 135, 1972
16. CHAUSSAIN, J.L., P.E.GARNIER, E.BINET, J.VASSAL,
R.SCHOLLER, J.C.JOB:
Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing
hormone (LH-RH) on the release of gonadotropins
in hypophyso-gonadal disorders of children and
adults. III. Hypopituitarism.
J.clin.Endocr. 38 : 58, 1974
17. CHEN, J.C., E.M.ZORN, M.C.HOLLBERG, R.C.WIELAND:
Antibodies to testosterone-3-bovine serum-
albumin, applied to assay of serum 17 β -ol
androgens.
Clin.Chem. 17 : 581, 1971

18. COPPAGE, W.S., A.E.COONER:
Testosterone in human plasma.
New Engl.J.Med. 273 : 9P2, 1965
19. CORVOL, P., M.B.LIPSETT:
Testosterone-estradiol binding globulin
(TeBG).
52. Meet.Endocr. Soc.: A. 73, 1970
20. DEBELJUK, L., A.ARIMURA, A.V.SCHALLY:
Lack of prolactin release-inhibiting activity
in synthetic LH-releasing hormone.
J.clin.Endocr. 35 : 918, 1972
21. DEMISCH, K., W.MAGNET, M.NEUBAUER, K.SCHÖFFLING:
Studies about unconjugated androstenediol
in human peripheral plasma.
J.clin.Endocr. 37 : 129, 1973
22. DONALD, R.A., E.A.ESPINER:
The plasma gonadotropin response to gonado-
tropin-releasing hormone in patients with
primary hypogonadism.
J.clin.Endocr. 39 : 364, 1974
23. DUFAU, M.L., K.J.CATT, T.TSURUHARA, D.RYAN:
Radioimmunoassay of plasma testosterone.
Clin.Chim.Acta 37 : 109, 1972
24. EIK-NES, K.B.:
Production and secretion of testicular steroids.
Rec.Progr.Horm.Res. 27 : 517, 1970
25. FAGLIA, G., P.BECK-PECCOZ, P.TRAVAGLINI, A.PARACCHI,
A.SPADA, A.LEWIN:
Elevations in plasma growth hormone concentra-
tions after Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
(LRH) in patients with active acromegaly.
J.clin.Endocr. 37 : 338, 1973
26. FINKELSTEIN, M., E.FORCHIELLI, R.I.DORFMAN:
Estimation of testosterone in human plasma.
J.clin.Endocr. 21 : 98, 1961
27. FRANCHIMONT, P.:
The regulation of Follicle Stimulation Hormone
and Luteinizing Hormone secretion in humans.
In: Frontiers in Neuroendocrinology (L.Martini,
W.F.Ganong, Eds.), Oxford University Press,
New York-London-Toronto 1971

28. FRANCHIMONT, P., D.MILLET, E.VENDRELY, J.LETAWÉ,
J.J.LEGROS, A.NETTER:
Relationship between spermatogenesis and serum
gonadotropin levels in azoospermia and oligo-
spermia.
J.clin.Endocr. 34 : 1003, 1972
29. FRASIER, S.D., R.HORTON:
Androgens in the peripheral plasma of pre-
pubertal children and adults.
Steroids 8 : 777, 1966
30. FUKUTANI, K., K.ISURUGI, H.TAKAYASU, K.WAKABAYASHI,
B.I.TAMAOKI:
Effects of depot testosterone therapy on serum
levels of luteinizing hormone and follicle
stimulating hormone in patients with Klinefelter's
syndrome and hypogonadotropic eunuchoidism.
J.clin.Endocr. 39 : 856, 1974
31. FURUYAMA, S., D.M.MAYES, C.A.NUGENT:
A radioimmunoassay for plasma testosterone.
Steroids 16 : 415, 1970
32. GONZALES-BARCENA, D., A.J.KASTIN, D.S.SCHALCH,
J.A.BERMUDEZ, D.LEE, A.ARIMURA, J.RUELAS, J.ZEPEDA,
A.V.SCHALLY:
Synthetic LH-Releasing Hormone (LH-RH)
administered to normal men by different routes.
J.clin.Endocr. 37 : 481, 1973
33. GOODFRIEND, L., A.SEHON:
Early approaches to production, analysis, and
use of steroid-specific antisera.
In: Immunologic methods in steroid determination
(F.G.Péron, B.V.Caldwell, Eds.), Shrewsbury Mass.,
1969
34. GOTTLIEB, C., K.S.LAU, L.R.WASSERMANN, V.HERBERT:
Rapid charcoal assay for intrinsic factor,
gastric juice unsaturated B12 binding capacity,
antibody to IF and serum unsaturated B12 binding
capacity.
Blood 25 : 875, 1965
35. GREEP, R.O., H.L.FEVOLD:
The spermatogenetic and secretory function of
the gonads of hypophysectomized adult rats treat-
ed with pituitary FSH and LH.
Endocrinology 21 : 611, 1937
36. HELLER, C.G., H.C.MORSE, M.SU, M.J.ROWLEY:
The role of FSH, ICSH, and endogenous testosterone
during testicular suppression by exogenous testo-
sterone in normal men.
In: The human testis (E.Rosemberg, C.A.Paulsen,Eds.),
Plenum Press, New York-London, 1970

37. HUDSON, B., J.P.COGLAN, A.DULMANIS:
Testicular function in man.
In: Endocrinology of the testis. CIBA found.
coll.Endocr. Vol. 16 (G.E.W. Westenholme,
M. O'Connor, Eds.) J. & A. Churchill Ltd.,
London, 1967
38. HUNTER, W.M., P.EDMOND, G.W.WATSON, N.MCLEAN:
Plasma LH and FSH levels in subfertile men.
J.clin.Endocr. 39 : 740, 1974
39. ISMAIL, A.A., G.D.NISWENDER, A.R.MIDGLEY jr.:
Radioimmunoassay of testosterone without chroma-
tography.
J.clin.Endocr. 34 : 177, 1972
40. ISMAIL, A.A., J.I.EVANS, A.W.MCLEAN, D.N.LOVE:
Variation in plasma testosterone during sleep.
J.Endocr. 48 : 469, 1970
41. ITO, T., R.HORTON:
Dihydrotestosterone dynamics in human
peripheral plasma.
52th Meet.Endocr.Soc., A.74, 1970
42. ITO, R., R.HORTON:
Dihydrotestosterone in human peripheral plasma.
J.clin.Endocr. 31 : 362, 1970
43. JOB, J.C., P.E.GARNIER, J.L.CHAUSSAIN, G.MILHAUD:
Elevations of serum gonadotropins (LH and FSH)
after releasing hormone (LH-RH) injections in
normal children and in patients with disorders
of puberty.
J.clin.Endocr. 35 : 473, 1972
44. Johnsen, S.G.:
The stage of spermatogenesis involved in the
testicular-hypophyseal feed-back mechanism
in man.
Acta Endocr. (Kbh.) 64 : 193, 1970
45. JUDD, H.L., D.C.PARKER, J.S.RAKOFF, B.R.HOPPER,
S.S.C.YEN:
Elucidation of mechanism(s) of the nocturnal
rise of testosterone in men.
J.clin.Endocr. 38 : 134, 1973
46. JUDD, H.L., R.REBAR, G.VANDENBERG, S.S.C.YEN:
Effect of Luteinizing Hormone - Releasing Factor
on Leydig cell function.
J.clin.Endocr. 38 : 8, 1974

47. KASTIN, A.J., A.V.SCHALLY, C.GUAL, A.ARIMURA:
Release of LH and FSH after administration
of synthetic LH-Releasing Hormone.
J.clin.Endocr. 34 : 753, 1972
48. KASTIN, A.J., D.GONZALEZ-BARCENA, H.FRIESEN, L.S.JACOBS,
D.S.SCHALCH, A.ARIMURA, W.H.DAUGHADAY, A.V.SCHALLY:
Unaltered plasma prolactin levels in man after
administration of synthetic LH-releasing hormone.
J.clin.Endocr. 36 : 375, 1973
49. KENT, J.R., A.B.ACONE:
Plasma testosterone levels and ageing in males.
In: Androgens in normal and pathological
conditions (A. Vermeulen, Ed.), Excerpta Med.
Found., Int.congr.series no. 101 : 31, 1966
50. KINOUCHI, T., R.HORTON:
3 α -androstenediol in human peripheral plasma.
J.clin.Endocr. 38 : 262, 1974
51. KIRSCHNER, M.A., M.B.LIPSETT, D.R.COLLINS:
Plasma ketosteroids and testosterone in man:
A study of the pituitary-testicular axis.
J.clin.Invest. 44 : 657, 1965
52. KLEY, H.K., W.WIEGELMANN, E.NIESCHLAG, H.G.SOLBACH,
H.ZIMMERMANN, H.L.KRÜSKEMPER:
LH, FSH and testosterone in plasma following
LH-RH infusion: a combined test for pituitary
and Leydig cell function.
Acta Endocr. (Kbh.) 75 : 417, 1974
53. KLINEFELTER, H.F., E.C.REIFENSTEIN, F.ALBRIGHT:
Syndrome characterized by gynecomastia,
aspermatozoogenesis, without hypogonadism, and
increased excretion of Follicle Stimulating
Hormone.
J.clin.Endocr. 2 : 615, 1942
54. KNORR, D.:
Testosteron und Pubertät.
Sympos.Dtsch.Ges.Endokr. 16 : 151, 1970
55. de KRETZER, D.M., H.G.BURGER, B.HUDSON:
The relationship between germinal cells and
serum FSH levels in males with infertility.
J.clin.Endocr. 38 : 787, 1974
56. de KRETZER, D.M., H.G.BURGER, D.FORTUNE, B.HUDSON,
A.R.LONG, C.A.PAULSEN, H.P.TAFT:
Hormonal, histological, and chromosomal studies
in adult males with testicular disorders.
J.clin.Endocr. 35 : 392, 1972

57. LEE, P.A., R.B.JAFFE, A.R.MIDGLEY jr., F.KOHEN,
G.D.NISWENDER:
Regulation of human gonadotropins: VIII.
Suppression of serum LH and FSH in adult males
following exogenous testosterone administration.
J.clin.Endocr. 35 : 636, 1972
58. LEMARCHAND-BÉRAUD, T., B.RUEDI, G.MAGRINI:
Effect of sex, age, menstrual cycle and various
pathological conditions on LH and FSH responses
to LRH.
Acta Endocr. (Kbh.) Suppl. 177 : 291, 1973
59. LEONHARD, J.M., R.B.LEACH, M.COUTURE, C.A.PAULSEN:
Plasma and urinary follicle stimulating hormone
levels in oligospermia.
J.clin.Endocr. 34 : 209, 1972
60. MAHOUDEAU, J.A., C.W.BARDIN, M.B.LIPSETT:
The metabolic clearance rate and origin of
plasma dihydrotestosterone in man and its conver-
sion to the 5a-androstanediols.
J.clin.Invest. 50 : 1338, 1971
61. MARSHALL, J.C., D.C.ANDERSON, T.R.FRASER, P.HARSOULIS:
Human Luteinizing Hormone in man: Studies of
metabolism and biological action.
J.Endocr. 56 : 431, 1973
62. MARSHALL, J.C., G.M.BESSER:
Clinical applications of the luteinizing
hormone-follicle stimulating hormone-releasing
hormone.
Proceed.Soc.Endocrin., 132nd meet., 33, 1973
63. MAURER, W., U.VOLKWEIN, J.TAMM:
The effect of intravenously administered human
chorionic gonadotropin on plasma levels of testo-
sterone and 5a-dihydrotestosterone in normal
subjects.
Acta Endocr.(Kbh.) 72 : 615, 1973
64. MAYES, D., C.A.NUGENT:
Determination of plasma testosterone by the use
of competitive protein binding.
J.clin.Endocr. 28 : 1169, 1968
65. MECKLENBURG, R.S., R.J.SHERINS:
Gonadotropin response to luteinizing hormone-
releasing hormone in men with germinal aplasia.
J.clin.Endocr. 38 : 1005, 1974
66. MILLER, O.N.:
Determination of bound vitamin B12.
Arch.Biochem.Biophys. 68 : 255, 1957

67. MURPHY, B.E.P.:
Protein binding and the assay of non-antigenic hormones.
Rec.Progr.Horm.Res. 25 : 563, 1969
68. MURRAY, M.A.F., C.S.CORKER:
Levels of testosterone and luteinizing hormone in plasma samples taken at 10-minute intervals in normal men.
J.Endocr. 56 : 157, 1973
69. NAFTOLIN, F., H.L.JUDD, S.S.C.YEN:
Pulsatile patterns of gonadotropins and testosterone in man: The effects of clomiphene with and without testosterone.
J.clin.Endocr. 36 : 285, 1973
70. NANKIN, H.R., P.TROEN:
Repetitive luteinizing hormone elevations in serum of normal men.
J.clin.Endocr. 33 : 558, 1971
71. NATRELLA, M.G.:
Experimental statistics.
National bureau of standards, Handbook 91, Washington 1963
72. NEWTON, J., W.P.COLLINS:
Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH/FSH-RH) in women with menstrual disorders.
Brit.Med.J. 3 : 271, 1972
73. NIESCHLAG, E., M.ROHR, H.WOMBACHER:
Leydig-Zellfunktionstest.
Klin.Wschr. 49 : 91, 1971
74. NUGENT, C.A., D.MAYES:
Reliability of plasma testosterone assays by competitive protein binding methods.
Acta Endocr. (Kbh.) Suppl. 147 : 257, 1970
75. PIRKE, K.M., P.DOERR:
Plasma dihydrotestosterone in normal adult males and its relation to testosterone.
Acta Endocr. (Kbh.) 79 : 357, 1975
76. PRESSMAN, D., A.L.GROSSBERG:
Structural basis of antibody specificity.
In: Immunologic methods in steroid determination.
(E.G.Péron, B.V.Caldwell, Eds.), Shrewsbury Mass., 1969

77. REBAR, R., S.S.C.YEN, G.VANDENBERG, F.NAFTOLIN,
Y.EHARA, S.ENGBLOM, K.J.RYAN, J.RIVIER, M.AMOSS,
R.GUILLEMIN:
Gonadotropin responses to synthetic LRF:
Dose-response relationship in men.
J.clin.Endocr. 36 : 10, 1973
78. REEVES, B.D., M.L.A. de SOUZA, I.E.THOMPSON,
E.DICZ-FALUSY:
An improved method for the assay of proge-
sterone by competitive protein binding.
Acta Endocr. (Kbh.) 63 : 225, 1970
79. RIVAROLA, M.A., C.BERGADA:
Testicular function in panhypopituitarism.
52nd Meet.Endocr.Soc., A.348, 1971
80. ROSEMBERG, E., J.F.CRIGLER, W.F.JAN, G.BULAT,
R.NAKANO, S.G.LEE:
Biologic effect of human pituitary luteinizing
hormone and human chorionic gonadotropin.
In: The human testis (E.Rosemberg, C.A.Paulsen,
Eds.), Plenum Press, New York-London, 1970
81. ROSENFELD, R.L., P.OTTO:
Androstenediol levels in human peripheral plasma.
J.clin.Endocr. 35 : 818, 1972
82. ROSENFELD, R.L., W.R.EBERLEIN, A.M.BONGIOVANNI:
Measurement of plasma testosterone by means of
competitive protein binding analysis.
J.clin.Endocr. 29 : 854, 1969
83. ROTH, J.C., M.M.GRUMBACH, S.L.KAPLAN:
Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing
factor on serum testosterone and gonadotropins
in prepubertal, pubertal and adult males.
J.clin.Endocr. 37 : 680, 1973
84. ROTH, J.C., R.P.KELCH, S.L.KAPLAN, M.M.GRUMBACH:
FSH and LH response to luteinizing hormone-
releasing factor in prepubertal and pubertal
children, adult males, and patients with hypo-
gonadotropic and hypergonadotropic hypogonadism.
J.clin.Endocr. 35 : 926, 1972
85. RUBIN, A.L., S.R.LEVIN, R.J.BERNSTEIN, J.B.TYRRELL,
C.NOACCO, P.H.FORSHAM:
Stimulation of growth hormone by luteinizing
hormone-releasing hormone in active acromegaly.
J.clin.Endocr. 37 : 160, 1973
86. RUBIN, R.T., P.R.GOUIN, A.LUBIN, R.W.POLAND, K.M.PIRKE:
Nocturnal increase of plasma testosterone in men:
Relation to gonadotropins and prolactin.
J.clin.Endocr. 40 : 1027, 1975

87. SAEZ, J.M., A.M.MORERA, J.BERTRAND:
Mésure de la concentration plasmatique de la
dihydrotestosterone.
Europ.J.clin.biol.Res. 16 : 284, 1971
88. SCHALLY, A.V., A.ARIMURA, Y.BABA, A.J.KASTIN, H.MATSUO,
T.W.REDDING, R.M.G.NAIR, L.DEBELJUK, W.F.WHITE:
Isolation and properties of the FSH- and LH-
releasing hormone.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 43 : 393, 1971
89. SCHALLY, A.V., A.ARIMURA, A.J.KASTIN, H.MATSUO, Y.BABA,
T.W.REDDING, R.M.G.NAIR, L.DEBELJUK, W.F.WHITE:
Gonadotropin-releasing hormones: One peptide
regulates secretion of luteinizing and follicle
stimulating hormones.
Science 173 : 1036, 1971
90. SCHWARZ, K.:
Pathophysiologie und Klinik der Hypophysen-
tumoren.
In: Östrogene. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York, 1969
91. SCHWARZSTEIN, L., N.P. de LABORDE, N.J.APARICIO,
D.TURNER, A.MIRKIN, A.RODRIGUEZ, F.R.LHULLIER,
J.M.ROSNER:
Daily variations of FSH, LH and testosterone
response to intravenous luteinizing hormone-
releasing factor (LRF) in normal men.
J.clin.Endocr. 40 : 313, 1975
92. SHENKMAN, L.:
Hypothalamic control of anterior pituitary
function.
Am.J.Med.Sciences 263 : 433, 1972
93. SHERINS, R.J., D.L.LORIAUX:
Studies on the role of sex steroids in the
feedback control of FSH concentrations in men.
J.clin.Endocr. 36 : 886, 1973
94. SILER, T.M., S.S.C.YEN:
Augmented gonadotropin response to synthetic
LRF in hypogonadal state.
J.clin.Endocr. 37 : 491, 1973
95. SOLBACH, H.G., W.WIEGELMANN:
Differentialdiagnose des männlichen Hypo-
gonadismus.
Verh.dtsch.Ges.Inn.Med. 76 : 264, 1970

96. SOLBACH, H.G., W.WIEGELMANN, H.K.KLEY, H.ZIMMERMANN, H.L.KRÜSKEMPER:
Die diagnostische Bedeutung des synthetischen LH-RH (Luteinisierungshormon-Releasinghormon) für die Überprüfung der gonadotropen Funktion des Hypophysenvorderlappens.
Dtsch.med.Wschr. 98 : 2114, 1973
97. SOUTHREN, A.L., G.G.GORDON, S.TACHIMOTO, G.PINZON, D.R.LANE, W.STYPULKOWSKI:
Mean plasma concentration, metabolic clearance rate and basal plasma production rates of testosterone in normal young men and women.
J.clin.Endocr. 27 : 686, 1967
98. SOUVATZOGLOU, A.:
Zur klinischen Bedeutung der radioimmunologischen LH-Bestimmung und der Stimulation der LH-Sekretion.
Habilitationsschrift, München, 1972
99. SPITZ, J.M., Y.DIAMANT, E.ROSEN, J.BELL, M.BEN DAVID, W.POLISHUK, D.RABINOWITZ:
Isolated gonadotropin deficiency: A heterogenous syndrome.
New Engl.J.Med. 290 : 10, 1974
100. STEINBERGER, E., M.CHOWDHURY:
Control of pituitary FSH in male rats.
Acta Endocr. (Kbh.) 76 : 235, 1974
101. TAMM, J.:
Testis.
In: Klinische Pathophysiologie (W.Siegenthaler, Hsg.)
Thieme Verlag, Stuttgart, 1973
102. TAMM, J., D.LINDENMAYER:
The effect of intravenously infused synthetic LRH on LH, testosterone and dihydrotestosterone in the plasma of normal male subjects.
Acta Endocr. (Kbh.) Suppl. 173 : 91, 1973
103. WAGNER, H., K.BÖCKEL, G.GROTE, M.HRUBESCH, K.FEGELER, W.H.HAUSS:
Überprüfung des Hypophysen-Gonaden-Funktionskreises mit synthetischem LH-Releasing-Hormon bei Patienten mit primärem Hypogonadismus vor und während der Therapie.
Med.Welt 24 : 1537, 1973
104. von WERDER, K.:
Wachstumshormone und Prolactin-Sekretion des Menschen.
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1975

105. WEST, C.D., D.K.MAHAJAN, V.J.CHAVRÉ, C.J.NABORS,
T.H.TYLER:
Simultaneous measurement of multiple plasma
steroids by radioimmunoassay demonstrating
episodic secretion.
J.clin.Endocr. 36 : 1230, 1973
106. WESTPHAL, U.:
Steroid-protein interactions.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971
107. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.clin.Invest. 39 : 1157, 1960
108. YEN, S.S.C., C.C.TSAI, G.VANDENBERG, R.REBAR:
Gonadotropin dynamics in patients with gonadal
dysgenesis: A model for the study of gonadotropin
regulation.
J.clin.Endocr. 35 : 897, 1972
109. YEN, S.S.C., G.VANDENBERG, R.REBAR, Y.EHARA:
Variation of pituitary responsiveness to synthetic
LRF during different phases of the menstrual cycle.
J.clin.Endocr. 35 : 931, 1972
110. YOUNG, H.H., J.R.KENT:
Plasma testosterone levels in patients with
prostatic carcinoma before and after treatment.
J.Urol. 99 : 788, 1968
111. ZÁRATE, A., J.GARRIDO, E.S.CANALES, J.SORIA, A.V.SCHALLY:
Disparity in the negative gonadal feedback control
for LH and FSH secretion in cases of germinal
aplasia or Sertoli-cell-only syndrome.
J.clin.Endocr. 38 : 1125, 1974

Lebenslauf

Ich wurde am 8. September 1949 in Straubing (Bayern) geboren. Meine Eltern sind der Ministerialrat Friedrich Köppl und seine Ehefrau Maria, geborene Steinbach.

Nach dem Besuch von vier Jahrgängen Volksschule in Passau trat ich 1959 in das dortige Humanistische Gymnasium ein. Wegen Umzugs meiner Eltern wechselte ich 1962 an das Hans-Carossa-Gymnasium Landshut über, das ich bis zu meinem Abitur im Jahre 1968 besuchte. Anschließend widmete ich zwei Semester dem Studium der Klassischen Philologie und der Archäologie an der Universität München. 1969 nahm ich, ebenfalls an der Universität München, das Medizinstudium auf. 1970 legte ich das Vorphysikum, 1972 das Physikum an der gleichen Universität ab. Anfang 1973 begann ich die Arbeit an der vorliegenden Dissertation.

Im Juni 1975 bestand ich an der Universität München das medizinische Staatsexamen.

